

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



CAMILA APARECIDA COTRIM

**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA QUERCETINA E
HECOGENINA SOBRE A ATIVIDADE FARMACOLÓGICA E
ENZIMÁTICA INDUZIDA POR sPLA2 ISOLADAS DE
VENENOS CROTÁLICOS E BOTRÓPICOS”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>CAMILA APARECIDA COTRIM</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.


Orientador: Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama

Campinas, 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C826a

Cotrim, Camila Aparecida

Avaliação dos efeitos da quercetina e hecogenina sobre a atividade farmacológica e enzimática induzida por sPLA2 isoladas de venenos crotálicos e botrópicos / Camila Aparecida Cotrim. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Marcos Hikari Toyama.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fosfolipase A2 secretória. 2. Quercetina, 3. Hecogenina. 4. *Crotalus durissus terrificus*. 5. *Bothrops pirajai*. I. Toyama, Marcos Hikari. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Evaluation of effects of quercetin and hecogenin on the pharmacological and enzymatic activities induced by sPLA2 isolated from crotalic and bothropic venoms.

Palavras-chave em inglês: Secretory phospholipase A2; Quercetin; Hecogenin; *Crotalus durissus terrificus*; *Bothrops pirajai*.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Marcos Hikari Toyama, Daniele Ribeiro de Araujo, João Henrique Ghilardi Lago.

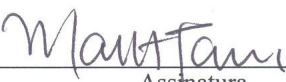
Data da defesa: 21/01/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

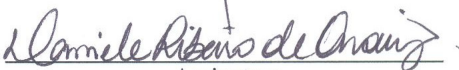
Campinas, 21 de Janeiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

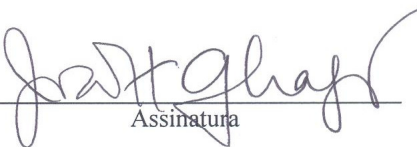
Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo


Assinatura

Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago


Assinatura

Prof. Dr. Adriana Souza Torsoni

Assinatura

Prof. Dr. Wagner Villegas

Assinatura

**Dedico este trabalho aos meus
pais Marli e Antonio, por todo
amor, carinho e compreensão.**

Obrigada pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e seu infinito amor.

Ao Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama – Campus Experimental Litoral Paulista – UNESP, pela orientação, ensinamentos, confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Ramos, Thiago Seraphim (Instituto de Química - UNICAMP), Prof. Dr. Edson Antunes e Lineu Baldissera Jr. (Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP) pela contribuição nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni pelos ensinamentos.

Ao meu marido Rafael, por todo amor, apoio, sugestões e paciência. Obrigada por fazer meus dias mais felizes.

A minha irmã Fernanda e minha avó Maria pelo amor e amizade.

As minhas eternas amigas Samira e Carla pela amizade e ótimos momentos juntas. Obrigado pelo apoio e incentivo.

A minha família de Araraquara: Carol, Fernandinho, Jú, Lucy, Sara, Simonex e Vi.

Aos amigos do Laquip, especialmente Eduardo, Simonex e Veronica, obrigada pela ajuda, sugestões e amizade.

Ao Paulinho Baldasso pela amizade e todo apoio técnico.

A todos funcionários do Departamento de Bioquímica.

A CNPq pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

Índice de Figuras.....	X
Abreviações.....	XII
Abreviações Aminoácidos.....	XIII
Resumo.....	XIV
Abstract.....	XVI
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Serpentes	2
1.1.1 Gênero Bothrops – <i>Bothrops pirajai</i>	2
1.1.2 Gênero Crotalus – <i>Crotalus durissus terrificus</i>	4
1.2 – Veneno – Aspectos Gerais	5
1.3 – Crotoxina	6
1.4 – Fosfolipase A2	9
1.4.1 Considerações Gerais	9
1.4.2 Fosfolipase A2 Secretória.....	11
1.5 – Inibidores de Fosfolipases A2	16
1.5.1– Metabólitos Especiais de Plantas	18
2 – OBJETIVOS	25
2.1 Gerais.....	25
2.2 – Específicos	25
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Animais:.....	26
3.2 Reagentes, Materiais:	26
3.3 Purificação do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e <i>Bothrops pirajai</i>	26

3.3.1 Purificação da sPLA2 de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	26
3.3.2 Purificação por troca iônica da sPLA2 de <i>Bothrops pirajai</i>	27
3.3.3 Purificação por fase reversa da sPLA2 de <i>Bothrops pirajai</i>	28
3.3.4 Tratamento químico das sPLA2 com quercetina e hecogenina	28
3.4 Caracterização Bioquímica	29
3.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	29
3.5 Análises espectroscópicas	29
3.5.1 Atividade Enzimática das sPLA2	29
3.5.2 Dicroísmo circular (CD)	30
3.5.3 Estudos de estabilidade	33
3.5.4 Fluorescência Intrínseca	34
3.5.5 Espectrometria de massa	37
3.6 Atividades Biológicas	38
3.6.1 Edema de Pata – inflamação	38
3.6.2 Creatina Quinase – miotoxicidade	39
3.6.3 Agregação plaquetária.	40
3.7 Modelagem Molecular – Docking	41
3.8 Análise Estatística	42
4 – RESULTADOS	43
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	43
4.1 Purificação da sPLA2	43
4.2 Quercetina	44
4.2.1 Tratamento– pré incubação	44
4.2.2 Atividade Enzimática das sPLA2	44

4.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	45
4.2.4 Dicroísmo Circular (CD).....	46
4.2.5 Estudos de Estabilidade	47
4.2.6 Fluorescência Intrínseca	49
4.2.7 Espectrometria de massas.....	50
4.2.8 Edema de Pata	51
4.2.9 Creatina Quinase – miotoxicidade	53
4.2.10 Agregação Plaquetária	56
4.2.11 Modelagem Molecular – Docking	58
5a – DISCUSSÃO	60
6a – CONCLUSÃO.....	65
4.3 Hecogenina - Sapogenina (CR01).....	67
4.3.1 Tratamento– pré incubação.....	67
4.3.2 Atividade Enzimática das sPLA2.....	67
4.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	70
4.3.4 Dicroísmo Circular (CD).....	71
4.3.5 Estudos de Estabilidade	72
4.3.6 Fluorescência Intrínseca	73
4.3.7 Edema de Pata	74
4.3.8 Creatina Quinase – miotoxicidade	76
5b – DISCUSSÃO	79
6b– CONCLUSÃO	83
<i>Bothrops pirajai</i>	84
4.1 Purificação e tratamento químico da sPLA2.	84
4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	86

4.3 Dicroísmo Circular (CD).....	86
4.4 Estudos de Estabilidade Térmica.....	87
4.5 Fluorescência Intrínseca	89
4.6 Edema de Pata	90
4.7 Creatina Quinase – miotoxicidade	90
4.8 Agregação plaquetária	92
5c– DISCUSSÃO	94
6c– CONCLUSÃO	97
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
8 – APÊNDICE	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do componente B (PLA2) de <i>Crotalus terrificus durissus</i>	07
Figura 2: Esquema da reação catalisada pela PLA2.....	09
Figura 3: Representação esquemática dos domínios funcionais da cPLA2.....	10
Figura 4: Estrutura secundária do monômero de PLA2.....	13
Figura 5: Esquema do mecanismo catalítico proposto para as sPLA2.....	14
Figura 6: Esquema mostrando o envolvimento dos resíduos 27-33, que compreendem a região de ligação com o calcio e sítio catalítico.....	16
Figura 7: Estrutura química do flavonóide	19
Figura 8: Estrutura química da quercetina.....	21
Figura 9: Estrutura química de uma saponina esteroideal.....	22
Figura 10: Estrutura química da hecogenina – CR01.....	24
Figura 11: Estrutura do substrato de PLA2 (4N3OBA).....	30
Figura 12: Perfil dos espectros de dicroísmo circular para α -hélices, folhas- β e estrutura random coil	33
Figura 13: Diagrama de Jablonski.....	35
Figura 14: Perfil cromatográfico do veneno total de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	43
Figura 15: Perfil cromatográfico das sPLA2 e sPLA2:Q em coluna C5.....	44
Figura 16: Ensaio enzimático da sPLA2 e sPLA2:Q	45
Figura 17: Perfil eletroforético de sPLA2 nativa e sPLA2:Q.....	46
Figura 18: Perfil espectroscópico de dicroísmo circular de sPLA2 e sPLA2:Q.....	47
Figura 19: Espectros de estabilidade em função de variações na temperatura.....	49
Figura 20: Espectro de emissão de fluorescência de sPLA2 e sPLA2:Q.....	50
Figura 21: Espectrometria de massa por MALDI-TOF de sPLA2 e sPLA2:Q.....	51
Figura 22: Formação de edema observada através do inchado da pata.....	52
Figura 23: Edema de pata induzido por sPLA2 e sPLA2:Q de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	52
Figura 24: Edema de pata induzido pela co-incubação de sPLA2 com três diferentes concentrações de quercetina.....	53

Figura 25: Ensaio de miotoxidade através dos níveis de creatina quinase.....	54
Figura 26: Miotoxidade após co-incubação da sPLA2 com quercetina.....	55
Figura 27: Ensaio de agregação plaquetária, gráfico dose dependente.....	57
Figura 28: Solução de docking para quercetina e sPLA2 (modelo de bastão).....	58
Figura 29: Esquema detalhado da região do sítio ativo da sPLA2 com quercetina.....	59
Figura 30: Perfil cromatográfico da sPLA2 antes e após tratamento com (CR01).....	67
Figura 31: Ensaio enzimático da sPLA2 e sPLA2:CR01 com 4N3OBA.....	68
Figura 32: Avaliação do efeito de CR01 sob a ação enzimática da sPLA2.....	70
Figura 33: SDS Page sPLA2 antes e após tratamento com CR01.....	71
Figura 34: Perfil espectroscópico de dicroísmo circular de sPLA2 e sPLA2:CR01.....	72
Figura 35: Espectro de estabilidade em função da temperatura.....	73
Figura 36: Espectro de emissão de fluorescência de sPLA2 e sPLA2:CR01.....	74
Figura 37: Formação do edema de pata de sPLA2 e sPLA2:CR01.....	75
Figura 38: Efeito da hecogenina sobre atividade edematogênica da sPLA2 no processo de co-incubação sPLA2 e CR01.....	75
Figura 39: Ensaio de miotoxidade através dos níveis de creatina quinase.....	77
Figura 40: Miotoxidade após co-incubação da sPLA2 com hecogenina (CR01).....	78
Figura 41: Perfil cromatográfico do veneno de <i>Bothrops pirajai</i> por troca iônica com coluna CM-5PW.....	84
Figura 42: Purificação da Lys49-sPLA2 por CLAE de fase reversa.....	85
Figura 43: Perfil eletroforético das amostras de Ly49-sPLA2 nativa e sPLA2:Q.....	86
Figura 44: Perfil espectroscópico de dicroísmo circular de Lys49-sPLA2 e sPLA2:Q.....	87
Figura 45: Espectros de estabilidade em função da temperatura de Lys49-sPLA2 e sPLA2:Q.....	88
Figura 46: Espectro de emissão de fluorescência de Lys49-sPLA2 (<i>Bothrops pirajai</i>), sPLA2:Q e quercetina.....	89
Figura 47: Formação do edema de pata após injeção de sPLA2 de <i>Bothrops pirajai</i>	90
Figura 48: Ensaio de miotoxidade através dos níveis de creatina quinase.....	91
Figura 49: Miotoxidade após co-incubação da sPLA2 com quercetina.....	92
Figura 50: Ensaio de agregação plaquetária, gráfico dose dependente.....	93

ABREVIACÕES

ADP – Adenosina difosfato

CD – Dicroísmo circular

CLAE (HPLC) – Cromatografia líquida de alta eficiência

CK – Creatina quinase

DMSO – Dimetilsulfóxido

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra ácido

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

MALDI-TOF – Espectrometria de massa (Ionização por dessorção a laser induzida por matriz)

NOBA – 4-Nitro-3-(octanoiloxi)-benzóico

PAGE-SDS – Eletroforese em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio

pBPB – Brometo de para-bromofenacil

TFA – Ácido trifluoroacético

ABREVIACÕES DE AMINOÁCIDOS

<i>Aminoácidos</i>	<i>Abreviação</i>	<i>Símbolo</i>
Alanina	ALA	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspático	Asp	D
Ácido Glutâmico	Glu	E
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	Hys	H
Isoleucina	Isso	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

Nomenclatura IUPAC

RESUMO

Nas últimas décadas, o uso de compostos naturais como flavonóides e sapogeninas tem sido largamente difundidos na indústria farmacêutica devido suas atividades antiinflamatórias, prevenção de câncer e de doenças cardiovasculares. Neste trabalho, foi avaliado o efeito da quercetina (flavonóide) e hecogenina (sapogenina), sobre as atividades catalítica e farmacológicas de uma isoforma de fosfolipase A2 secretória (sPLA2) de *Crotalus durissus terrificus* em duas situações: pré-incubado e co-incubado. Na pré-incubação, a sPLA2 pura foi incubada com os compostos e os resultados indicam modificações estruturais na estrutura secundária como evidenciada pelas análise de dicroísmo circular. Os dois compostos foram capazes de diminuir a atividade enzimática, porém, somente a quercetina foi capaz de diminuir a mionecrose. Nenhum dos compostos apresentou efeito sobre a formação de edema. Na co-incubação, três concentrações diferentes dos compostos foram misturados com sPLA2 e imediatamente testados. A co-incubação mostrou uma menor ação sobre atividade catalítica quando comparado com a pré-incubação, sugerindo a importância da incubação dos compostos com a proteína. Entretanto, a co-incubação mostrou melhor efeito sobre as atividades farmacológicas (edema e miotoxidade). Os resultados obtidos sugerem a existência de dois sítios farmacológicos distintos, um relacionado com sítio enzimático e outro distinto dessa atividade. Além disso, estudos de docking realizados entre a sPLA2 e a quercetina mostraram a existência de ligações de hidrogênio, interações polares e hidrofóbicas, sugerindo que outros flavonóides com estruturas similares podem se ligar à sPLA2. Além de avaliar o efeito da quercetina sobre a sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus* foi avaliado o efeito sobre uma sPLA2 cataliticamente inativa (Lys49-sPLA2) de *Bothrops pirajai*. O resultado de dicroísmo

circular não apresentou modificações em nível de estrutura secundária, entretanto, estudo de estabilidade mostrou que a quercetina leva a uma maior estabilidade térmica da estrutura proteica frente a altas temperaturas, tornando o processo de desnaturação reversível. Apesar da ausência de atividade catalítica, Lys49-sPLA2 apresentou formação de edema, miotoxidade e uma baixa agregação plaquetária. Entretanto, nenhuma das atividades farmacológicas foi inibida significativamente pela quercetina. Os resultados apresentados mostram que o uso de compostos fenólicos são uma boa iniciativa para estudar e melhor entender as ações de sPLA2 purificadas do veneno de serpente.

ABSTRACT

In the last decades, the use of natural compounds, such as flavonoids and sapogenins has been applied to various pharmaceutical industries due their anti-inflammatory, cancer preventive and cardiovascular protective activities. In this study was evaluated the effect of quercetin (flavonoid) and hecogenin (sapogenin) on the catalytic and pharmacological activity of a secretory phospholipase A2 from *Crotalus durissus terrificus* in two different situations: pre-incubated and co-incubated. In the pre-incubation situation, native sPLA2 was incubated with the compounds and the results have shown structural modifications in secondary structure as evidenced through circular dichroism. Both compounds were able to decrease catalytic activity, however, just quercetin was able to decrease myonecrosis. None of the compounds have shown effects on the oedema formation. In the co-incubation, three different concentrations of both compounds were mixed with sPLA2 and immediately tested. Co-incubation has shown lesser effect on catalytic activity than pre-incubation, suggesting an important role of incubation process. Nevertheless, co-incubation presented better effects in pharmacological activities (oedema and myotoxic). These results suggest the existence of two pharmacological sites in the protein, one that is correlated with the enzymatic site and another that is distinct from it. In addition, molecular docking studies between sPLA2 and quercetin showed the existence of hydrogen-bonded, polar interactions and hydrophobic interactions, suggesting that other flavonoids with similar structures could bind to sPLA2. Besides to evaluate the effect of quercetin on a *Crotalus durissus terrificus* sPLA2, was also evaluated the effect of this compound on a sPLA2 inactive catalytically (Lys49-sPLA2) from *Bothrops pirajai*. Dichroism circular results did not show modifications in secondary structure, however, thermal stability study have shown that quercetin is able to

increase the stability of sPLA2 in high temperatures, in addition to become the denaturation a reversible process. Despite of the lack of catalytic activity, Lys49-sPLA2 has shown oedema formation, myotoxic and a low platelet aggregation. Although none of pharmacological activities was significantly abolish by quercetin. The results have shown that the use of phenolics compounds are a good point to study and better understand the actions of sPLA2 purified from venom snake.

1 – INTRODUÇÃO

O Brasil está incluído no grupo dos países com altos níveis de diversidade biológica devido aos diferentes biomas e ecossistemas que o caracterizam (Silva, 2003), tendo somente como concorrente pelo título de nação biologicamente mais rica do planeta, a Indonésia (Mittermeier et al., 2005). É considerado um país rico na diversidade genética vegetal – mais de 55.000 espécies catalogadas num total estimado entre 350.000 e 550.000 (Simões et al., 2000; Giuliatti et al., 2005). No entanto, apenas 8% das espécies vegetais estudadas com características bioativas, e apenas 1.100 espécies avaliadas em suas propriedades medicinais. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável, principalmente no campo do desenvolvimento de novos medicamentos (Calixto, 2003).

Nas últimas décadas, tem se verificado um grande avanço científico envolvendo estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais com o objetivo de obter compostos com propriedades terapêuticas (Cechinel Filho e Yunes, 1997; Rates, 2001).

A busca de novos compostos obtidos a partir de plantas tem proporcionado à indústria farmacêutica uma fonte de pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos (Schenkel et al., 1999), já que os princípios ativos obtidos têm se mostrado promissores no tratamento de neoplasias, doenças inflamatórias dentre outras. No caso do envenenamento por picada de serpentes, antes do uso da soroterapia como método efetivo, os registros escritos ou documentados da história de nosso país descrevem o uso principalmente de métodos fitoterápicos, conhecido como fase pré-soroterapia.

No Brasil existem referências de alguns tratamentos utilizados contra esse tipo de envenenamento que foram incorporados da cultura indígena. A espécie de planta mais

conhecida é a *Aristolochia sp.*, cujo extrato experimentalmente foi capaz de neutralizar a ação do veneno botrópico (Martz, 1992). O extrato de *Curcuma longa* – Zingiberaceae, popularmente conhecida como açafrão, foi capaz de neutralizar a ação letal induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* (Ferreira et al., 1992), e de inibir a ação neurotóxica de *Naja naja siamensis* (Borges et al., 2001). O extrato vegetal de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) também se mostrou como inibidor da atividade edematogênica de *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararacassu* (Borges, et al., 2000). Iglesias e colaboradores (2005) mostraram que o flavonóide morina quando incubado com fosfolipases A2 (PLA2) de *Crotalus durissus cascavella* induziu modificações em nível de estrutura secundária e aminoácidos aromáticos, levando uma inibição da atividade enzimática através de um desenovelamento parcial da PLA2. Entretanto estas mudanças não foram capazes de diminuir o edema agudo, miotoxicidade e agregação plaquetária induzida pela PLA2.

Recentemente, nosso grupo demonstrou que a 7-hidroxicumarina (umberiferona), ao contrário do que foi observado para a morina, foi capaz de inibir, não somente a atividade enzimática, mas propriedades indutoras do processo inflamatório, tais como edema de pata, degranulação de mastócitos e concomitantemente levar a mudanças em nível de estrutura secundária da PLA2 (Toyama et al., 2009).

1.1 – SERPENTES

1.1.1 GÊNERO BOTHROPS – *Bothrops pirajai*.

As serpentes do gênero *Bothrops* são encontradas em todo o território nacional, totalizando vinte espécies. Habitam zonas rurais e periféricas de grandes cidades,

preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (paióis, celeiros, depósitos de lenha). Apresentam hábitos predominantemente noturnos e são consideradas de grande importância do ponto de vista epidemiológico, médico e social no Brasil, já que são responsáveis por 85-90% do número de acidentes registrados (Mancuso et al., 1995; Pinho e Pereira, 2001).

A espécie *Bothrops pirajai* é encontrada no sul do estado da Bahia, é morfológicamente muito parecida com a *Bothrops jararacussu* (Toyama et al., 1998) e seu veneno contém miotoxinas como aquelas encontradas na *B. jararacussu* (Costa et al., 1999).

O veneno botrópico contém várias toxinas ativas, tais como serinoproteases, metaloproteases e fosfolipase A2, sendo este último o grupo mais importante (Mancuso et al., 1995). O veneno apresenta três atividades principais: proteolítica ou necrosante, que determina edema inflamatório na região da picada; coagulante, atuando através de componentes que interagem com proteínas da cascata de coagulação, por exemplo, o ativador do Fator V (RVV-V) uma glicoproteína que atua na conversão do fator V em V_a através de clivagens em ligações peptídicas; hemorrágica, devido à presença de componentes, dentre eles as fosfolipases A2 que atua inibindo o fator X de coagulação e inibindo a formação do complexo protrombinase através de fosfolipídios envolvidos no complexo (Markland, 1998). Outras atividades como: fibrinogenolítica, fibrinolítica e agregação plaquetária podem participar da fisiopatologia do envenenamento (Ribeiro e Jorge, 1997).

1.1.2 GÊNERO CROTALUS – *Crotalus durissus terrificus*

O gênero *Crotalus* está representado no Brasil por apenas uma espécie, a *Crotalus durissus* (Pinho e Pereira, 2001; Fernandes et al., 2008), e distribuídas em cinco subespécies: *C. durissus terrificus*, encontrada nas zonas altas e secas da região sul oriental e meridional; *C. durissus collilineatus*, presentes nas regiões secas da região centro-oeste, Minas Gerais e norte de São Paulo; *C. durissus cascavella*, encontrada nas áreas da caatinga do nordeste; *C. durissus ruruima*, observada na região norte do país; e *C. durissus marajoensis*, presente nas regiões próxima a Ilha de Marajó (Pinho e Pereira, 2001).

Essas subespécies são encontradas em campos abertos, áreas secas, arenosas e pedregosas, raramente na faixa litorânea. Quando ameaçadas, denunciam sua presença pelo ruído característico do guizo ou chocalho, presente na cauda (Sano-Martins et al., 2001). Anualmente cerca de 1500 casos de mordidas são registrados no caso por envenenamento de serpentes no Brasil são causados pela *Crotalus durissus terrificus* (Evangelista et al., 2008).

O veneno crotálico quase não produz lesão local, possuindo principalmente três atividades com importância clínica conhecida: “trombina-like”, atuando como coagulante através da degradação da fibrina pelo sistema fibrinolítico (Marsh et al., 2005; de Oliveira et al., 2009); miotóxica sistêmica, podendo causar uma intensa quebra do tecido muscular esquelético (rabdomiólise) com liberação de enzimas, como a creatina quinase (CK) e mioglobina; e neurotóxica, devido a crotoxina que se liga nos receptores de membrana pré-sinápticos inibindo a liberação de acetilcolina causando bloqueio neuromuscular (Kini, 2003).

1.2 – VENENO – ASPECTOS GERAIS

O veneno de serpentes é uma mistura de componentes ativos cujo objetivo é captura e digestão da presa, além de uso na defesa contra predadores (Meier e Stocker, 1995). Os componentes do veneno podem variar de acordo com localização geográfica, estação do ano e idade da serpente (Dhananjaya e D'Souza, 2010). Em torno de 90 a 95% do peso seco do veneno de serpentes é constituído por proteínas, as quais apresentam importantes funções biológicas quando comparadas com a fração não protéica, que é constituída por sais, açúcares, íons e lipídios (Tu, 1977; Tu, 1982).

A porção protéica do veneno das serpentes é constituída principalmente por enzimas de natureza hidrolítica:

Oxirredutases – basicamente dois tipos dessa enzima são encontrados no veneno total das serpentes, a L-aminoácido oxidase, que converte o aminoácido livre a um alfacetoácido (Meister, 1965; Mebs, 1970), e a lactato desidrogenase, responsável pela catálise da reação de conversão do lactato a ácido pirúvico (McLean et al., 1971).

Fosfatases – são enzimas que quebram ligações fosfomonoéster e fosfidiésteres, sendo que as fosfodiesterases são as mais conhecidas e muito utilizadas como ferramenta no seqüenciamento ou caracterização de oligonucleotídeos e polinucleotídeos (Laskowsky, 1971).

Glicosídates – um exemplo dessa enzima é a hialuronidase, capaz de catalisar a reação de hidrólise do ácido hialurônico, facilitando a difusão das toxinas do veneno para dentro do tecido das vítimas. Este ácido hialurônico é um mucopolissacarídeo, encontrado na pele e nos tendões (Meyer et al., 1960).

Proteases – um grande número dessas proteínas é encontrado no veneno total, e quase todas dependem de co-fatores como íons metálicos (cálcio e magnésio) para atividade. Podem ser classificadas em dois grandes grupos: as exopeptidases e as endopeptidases (Iwanaga et al., 1976).

Lipases – são enzimas lipolíticas, tais como as fosfolipases. As fosfolipases A2 são as mais estudadas devido a sua importância em processos inflamatórios (Tu, 1977).

1.3 – CROTOXINA

O veneno da *Crotalus durissus terrificus* contém quatro proteínas com ação neurotóxica: a convulxina, capaz de produzir convulsão e agregação plaquetária; giroxina, que possui atividade *trombina-like*; crotamina, que produz espasmos no músculo esquelético e crotoxina, que é o principal componente tóxico do veneno e que além da ação neurotóxica apresenta ação miotóxica (Toyama et al., 1999; Toyama et al., 2000; Santos et al., 2007).

A crotoxina é um complexo protéico que foi isolado e cristalizado em 1938 por Slotta (Slotta e Fraenkel-Conrat, 1930) e Fraenkel-Conrat (Hendon e Fraenkel-Conrat, 1971). É um heterodímero constituído por duas subunidades distintas: uma fosfolipase A2 (PLA2) básica (Componente B, CB) de massa molecular de 14.350 Da e pI de aproximadamente 8,2, e um componente não enzimático de massa molecular de 9.490 Da e de pI aproximado 3,4 chamado crotapotina (Componente A, CA) que é farmacologicamente inativo e funciona como uma proteína chaperona para a PLA2 aumentando a atividade biológica desta (Toyama et al., 2003; Miyabara et al., 2004, Santos et al., 2007).

Em 2007 Marchi-Salvador e colaboradores, cristalizaram duas isoformas de PLA2-asp49 (componente B) (Figura 1) mostrando a formação de um tetrâmero através da associação de dois dímeros quase idênticos.

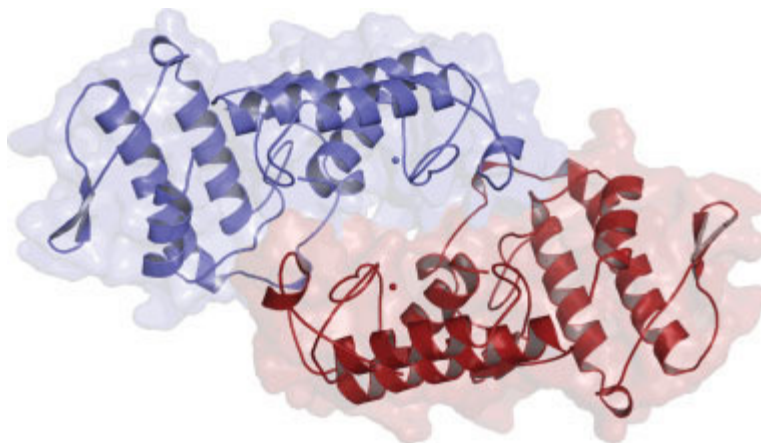


Figura 1: Esquema do componente B (PLA2) de *Crotalus terrificus durissus*. (Marchi-Salvador et al., 2008)

As duas subunidades da crotoxina funcionam de maneira sinérgica. A crotopotina aumenta a capacidade da PLA2 encontrar o alvo em junções neuromusculares e assim aumentar sua letalidade, entretanto reduz a atividade enzimática da PLA2 (Perales et al., 1995).

O mecanismo de ação da crotoxina envolve o bloqueio da transmissão de impulsos nervosos em junções neuromusculares, dos quais decorrem as paralisias motoras apresentadas pelas vítimas. A junção neuromuscular é uma região especializada da fibra muscular, onde o impulso nervoso ao atingir a terminação nervosa pré-sináptica, determina a sua despolarização e liberação do neurotransmissor acetilcolina (Doley e Kini, 2009; Sampaio et al., 2010). Existem dois mecanismos para explicar a inibição da contração muscular pela crotoxina, um envolvendo atividade pré-sináptica e outro pós-sináptico. Na

ação pré-sináptica a crotoxina inibe a liberação da acetilcolina e na pós-sinápticas atua bloqueando a resposta à acetilcolina através da estabilização do receptor de acetilcolina convertendo-o a um estado inativo (Bon et al., 1979).

Além do efeito neurotóxico, a crotoxina também afeta as células dos músculos esqueléticos (Doley e Kini 2009). Evidências indicam que o envenenamento por *Crotalus durissus terrificus* é caracterizado por uma miotoxicidade sistêmica e rabdomiólise, que causa lesão muscular e altos níveis no plasma de enzimas derivadas do músculo, como a creatina quinase (CK) e mioglobínúria (Gutiérrez et al., 2008).

Os sinais característicos da ação miotóxica são dores musculares generalizadas, urina com coloração avermelhada (mioglobínúria) e necrose da musculatura esquelética (rabdomiólise) (Gopalakrishnakone et al., 1981). Segundo Gutiérrez e colaboradores (2008) a crotoxina B (PLA2) é responsável pela atividade miotóxica não sendo necessário a crotoxina A, entretanto, a ausência da subunidade A diminui o potencial da atividade quando comparada com a crotoxina.

Nos últimos anos, a crotoxina tem recebido grande atenção devido a sua atividade citotóxica *in vitro* contra uma variedade de células tumorais humana. A eficácia antitumoral *in vivo*, usando administração diária de crotoxina tem sido demonstrada em carcinoma Lewis de pulmão e carcinoma mamário humano MX-1 inibindo 83% e 69% do crescimento respectivamente (Newman et al., 1993). Uma menor inibição foi observada em células com leucemia, indicando uma especificidade da crotoxina com tumores sólidos (Santos et al., 2007).

1.4 – FOSFOLIPASE A2

1.4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As fosfolipases A2 (PLA2) (E.C 3.1.1.4) são enzimas largamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em plantas, bactéria e tecidos animais tais como coração, fígado, baço e pulmão. Foram primeiramente descobertas no suco pancreático e em venenos de cobras e abelhas por volta dos anos 80 (Nevaleinen et al., 2008). São proteínas relativamente pequenas, com massa molecular variando entre 13 e 25 kDa, e estão envolvidas em muitos processos celulares, tais como, crescimento celular, diferenciação, imunorregulação e processos inflamatórios (Kim et al., 2001).

A reação catalisada pela PLA2 (Figura 2) é dependente de cálcio e proporciona a liberação de ácidos graxos e lisofosfolipídios. A hidrólise ocorre na posição *sn*-2 do glicerol na interface lipídio/água, pois as enzimas atuam preferencialmente em substratos agregados com micela, bicamadas ou lipoproteínas. (Dennis 1994; Kini e Chan, 1999, Burke e Dennis, 2009). *In vivo* a posição *sn*-2 dos fosfolipídios freqüentemente contém ácidos graxos poli-insaturados que quando liberados podem ser metabolizado em moléculas de eicosanóides (Burke e Dennis, 2009).

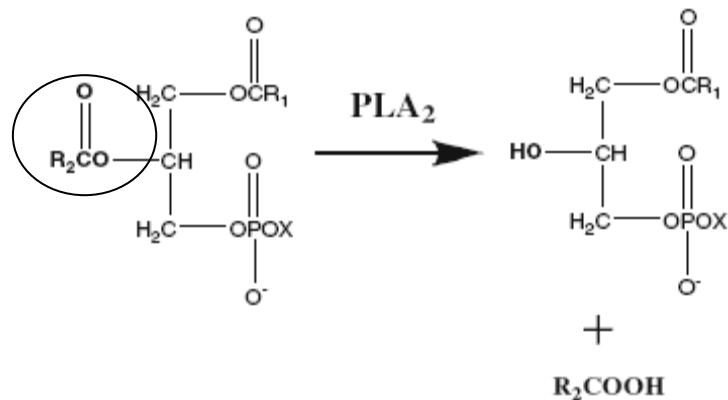


Figura 2: Esquema da reação catalisada pela PLA2. A esquerda o fosfolipídio e à direita o lisofosfolipídio e o ácido graxo (Burke & Dennis, 2009).

As PLA2 podem ser classificadas em cinco grupos principais: PLA2 secretoras (sPLA2), PLA2 citosólicas Ca^{2+} -dependente (cPLA2), PLA2 citosólicas Ca^{2+} -independente (iPLA2), PAF acetilhidrolases e PLA2 lisossomais (Burke e Dennis, 2009).

As cPLA2 ou grupo IV PLA2, são enzimas com alto peso molecular (85 kDa) encontradas no citosol (Cummings et al., 2000). São caracterizadas por possuir um sítio ativo de serina e ácido aspártico, além da necessidade de Ca^{2+} para atividade catalítica (Burke e Dennis, 2009). As cPLA são capazes de desorganizar a membrana em resposta a um aumento na concentração de cálcio intracelular através de um domínio cálcio-lipídio-binding (CaLB) presente no interior da proteína. A cPLA2 é uma das poucas enzimas específica para fosfolipídios contendo ácido araquidônico na posição *sn*-2 (Dennis, 1994; Chakraborti, 2003). O ácido araquidônico é o precursor para a geração de eicosanóides e é atribuído à cPLA o papel em doenças inflamatórias, já que foi demonstrado em ratos *knockout*, que a ausência do gene da cPLA reduziu os efeitos de muitas doenças inflamatórias (Burke e Dennis, 2009). A Figura 3 mostra um esquema da estrutura primária da cPLA (Chakraborti, 2003).



Figura 3: Representação esquemática dos domínios funcionais da cPLA2. O domínio C2 na região N-terminal medeia a ligação membrana Ca^{2+} - dependente. S 505 (Ser505) é o sítio fosforilado pela MAP quinases. Os resíduos catalíticos S 228 (Ser228) e D (549)/(Asp549) também estão representados (Chakraborti, 2003).

As enzimas iPLA2 fazem parte da família GVI das fosfolipases A2 e são caracterizadas por não necessitarem de cálcio para atividade catalítica. Como as cPLA, as iPLA2 usam a serina no sítio ativo para catalisar a hidrólise da ligação *sn*-2, entretanto não apresentam especificidade pelo ácido araquidônico na posição *sn*-2. Dentre as funções celulares dessas enzimas pode-se destacar a formação óssea, apoptose e secreção de insulina. (Burke e Dennis, 2009)

As PAF acetilhidrolases são da família GVII das fosfolipases A2. Receberam esse nome devido a habilidade de clivar o grupo acetil da posição *sn*-2 de fatores de ativação plaquetário (PAF), porém a denominação é errônea já que as PAF podem também decompor lipídios oxidados na posição *sn*-2 até 9 carbonos ao longo da cadeia e não somente PAF. O sítio ativo é composto por uma serina, histidina e ácido aspártico. Estudos recentes identificaram regiões na extremidade C-terminal da enzima que são importantes para ligação de HDL e LDL (Burke e Dennis, 2009).

1.4.2 FOSFOLIPASES A2 SECRETÓRIAS

As PLA2 secretórias (sPLA2) foram o primeiro tipo de PLA2 descobertas. São encontradas em diversas fontes tais como: venenos de cobras, escorpiões, abelha, componentes do suco pancreático e em diversos tecidos de mamíferos (Burke e Dennis, 2009).

São divididas em 5 grupos I (IA, IB), II (IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF), III, V e X dependendo da estrutura primária caracterizada pelo número e posição de resíduos de cisteína (Fonteh et al., 2000; Chakraborti, 2003). Dentre esses grupos os mais estudados são os grupos I, composto por PLA2 de pâncreas de mamíferos e de veneno de serpentes

pertencentes às famílias Elapidae e Hydrofidae, grupo II, formado por PLA2 de venenos pertencentes às famílias Crotalidae e Viperidae e grupo III formado principalmente por venenos de abelhas e lagartos (Dennis, 2000).

As sPLA2 constituem os principais componentes dos venenos das serpentes e tem sido extensivamente investigados não só devido sua vasta gama de efeitos biológicos, mas também devido sua grande familiaridade com a estrutura e função catalítica das enzimas de mamíferos (Soares e Giglio, 2003; Evangelista et al., 2008). Entretanto, em contraste com as enzimas de mamíferos, apresentam toxicidade (Kini e Chan, 1999).

O principal papel das sPLA2 presente no veneno de cobra, assim como outras proteínas, é contribuir para o processo de imobilização e digestão da presa. Isso ocorre devido à habilidade dessa enzima em induzir vários efeitos farmacológicos tais como, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, miotoxicidade, atividade anticoagulante, indução de edema e efeito hemorrágico (Lambeau et al., 1996; Kini e Chan 1999).

Um único veneno de cobra apresenta múltiplas formas de sPLA2. Essas isoenzimas induzem diferentes efeitos biológicos. Uma análise nos genes da sPLA2 mostrou que mutações ocorrem mais em regiões exons do que em regiões introns. Assim, propõe-se que muitas das formas da PLA2 e sua capacidade farmacológica têm evoluído através de uma duplicação gênica e seleção positiva (Kini e Chan, 1999).

As sPLA2 são caracterizadas pelo baixo peso molecular (13-15 kDa), uma α -hélice 1 amino terminal anfipática (resíduos 2-13), um loop para ligação com Ca^{2+} , duas α -hélices 2 e 3 antiparalelas (resíduo 40-53 e 90-108), dois filamentos pequenos de folhas- β antiparalelas, a asa- β (resíduo 75-84), loop carboxi terminal (resíduos 109-133) e 6 ligações

dissulfeto podendo haver uma ou duas variações que auxiliam na estabilidade da enzima (Murakami e Kudo, 2002) (Figura 4).

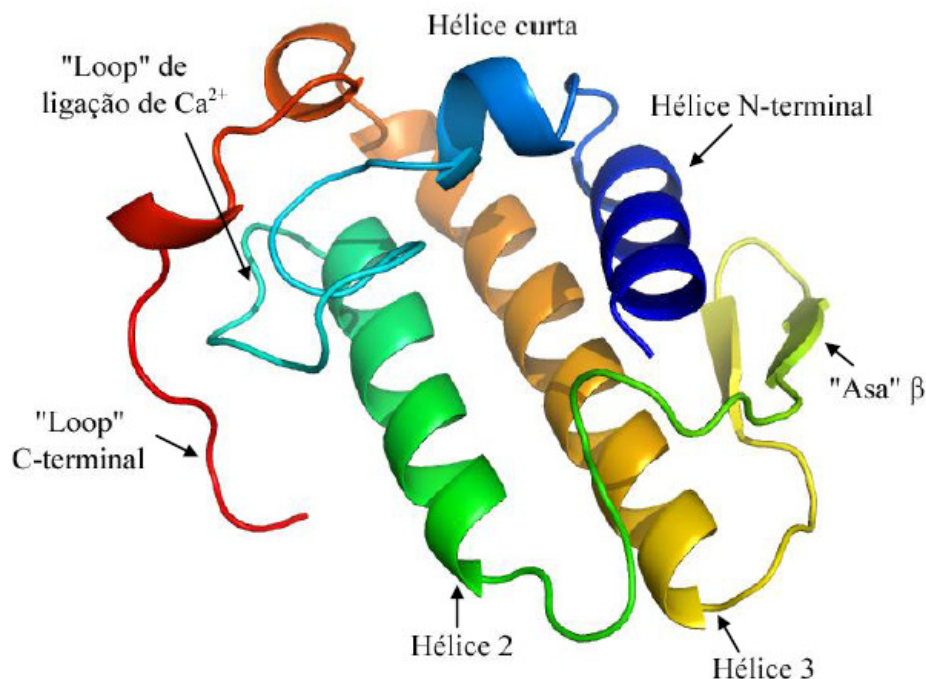


Figura 4: Estrutura secundária do monômero de PLA2. Predição *in silico* realizada pelo programa Pymol (Delano 2002)

As sPLA2 botrópicas ou crotáticas, que formam os grupos mais estudados, são proteínas de massa molecular em torno de 15kDa com 120 resíduos de aminoácidos e pI entre 7,8 a 8,5; são, portanto, proteínas básicas que em geral apresentam a formação de dímeros (Toyama et al., 1995; Toyama et al., 1998; Toyama et al., 2000).

A catálise da sPLA2 secretória é análoga ao mecanismo de ação das serino proteases envolvendo as cadeias laterais dos resíduos de Asp-99, His-48 e uma molécula de água (Scott & Sigler, 1994). No mecanismo de catálise proposto, (Figura 5) um próton na posição 3 do anel imidazólico da His-48 está envolvido em uma forte interação com o grupo carboxílico da Asp-99, impedindo que ocorra uma rotação no anel imidazólico,

deixando o nitrogênio da posição 1 deste anel na posição espacial própria para um ataque na molécula de água. Esse ataque promove a liberação de uma hidroxila devido à transferência de um próton da molécula de água para o nitrogênio na posição 1 do anel da His-48, enquanto o próton na posição 3 do anel é transferido para o Asp-99 devido a uma mudança de cargas na molécula. A hidroxila formada promove então um ataque nucleofílico ao carbono do grupo éster do substrato, formando um intermediário. Em seguida o oxigênio do grupo éster ataca o próton da posição 1 do anel imidazólico para formação de um álcool de lisofosfolípido e a dupla ligação entre o carbono e o oxigênio do grupo éster é refeita ocorrendo então a hidrólise da união acil-éster na posição sn-2 e liberando os dois produtos formados: um fosfolípido e um ácido graxo (Verheij et al., 1980).

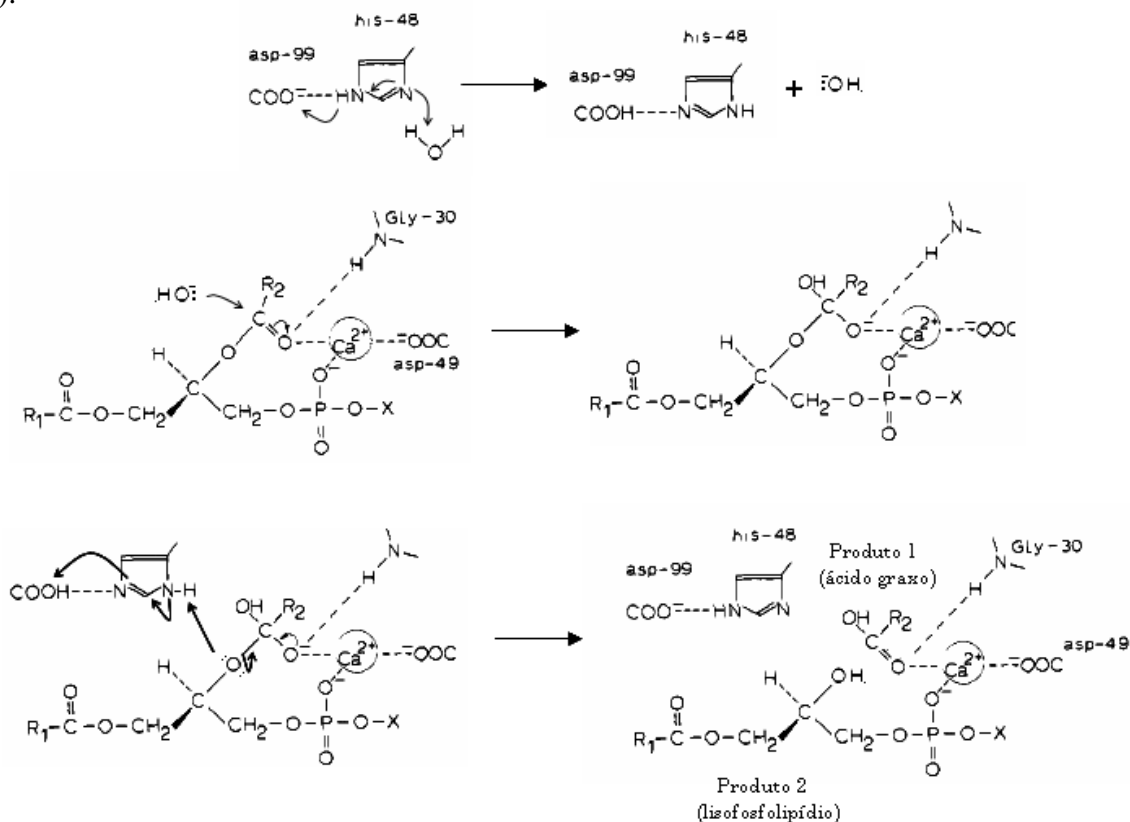


Figura 5: Esquema do mecanismo catalítico proposto para as sPLA2. (Verheij et al., 1980, modificado).

O sítio para união do cálcio, importante para a catálise, apresenta um cátion ligado pelo oxigênio do grupo carbônico dos resíduos Tyr-28, Gly-30, Gly-32 e por oxigênio da cadeia lateral do resíduo Asp-49. No mecanismo de catálise, o cálcio tem dupla função: fixar o fosfato e estabilizar a carga negativa do oxigênio do grupo carbônico da ligação éster na posição sn-2 do substrato (Yang, 1994).

Alguns resíduos que compõem o sítio catalítico, tais como His48, Try52 e Asp99 são mantidos em miotoxinas de *Bothrops*, entretanto, uma importante modificação pode ocorrer no sítio de ligação de Ca^{2+} , uma substituição do ácido aspártico por uma lisina na posição 49 (Lys49-PLA2) (Soares et al., 2004).

A primeira Lys49-PLA2 foi primeiramente reportada em veneno de *Agkistrodon p. piscivorus* e *Bothrops atrox* em 1984 (Maraganore et al., 1984). A princípio foi atribuída uma pequena atividade de PLA2 a proteína, mas após estudos de recombinação com Lys49 foi provado que essa mutação leva a perda da atividade catalítica (Lomonte 2009). Entretanto, atividades farmacológicas tais como formação de edema e miotoxina foram observadas (Mora et al., 2005). Stábeli e colaboradores (2006) mostraram que uma miotoxina – Lys49 de *Bothrops moojeni* é capaz de induzir mionecrose em fibras musculares, formação de edema e bloqueio na junção neuromuscular. Resultados similares foram observados para uma Lys49-PLA2 isolada do veneno do *Bothrops alternatus* (Ponce-Soto et al., 2007).

Em 1998, Ward e colaboradores propuseram através de cristalografia um modelo para a ligação do íon Ca^{2+} nas Asp49-PLA2 e Lys49-PLA2. De acordo com o modelo o átomo Nε da Lys49 (Figura 6b) ocupa exatamente a posição ocupada pelo íon Ca^{2+} na PLA2 cataliticamente ativa (Figura 6a). A posição dos outros resíduos envolvidos na atividade

catalítica é conservada na Lys49-PLA2 sugerindo que o átomo Nε causa um efeito estérico dificultando e em alguns casos impedindo a ligação com o co-fator Ca^{2+} .

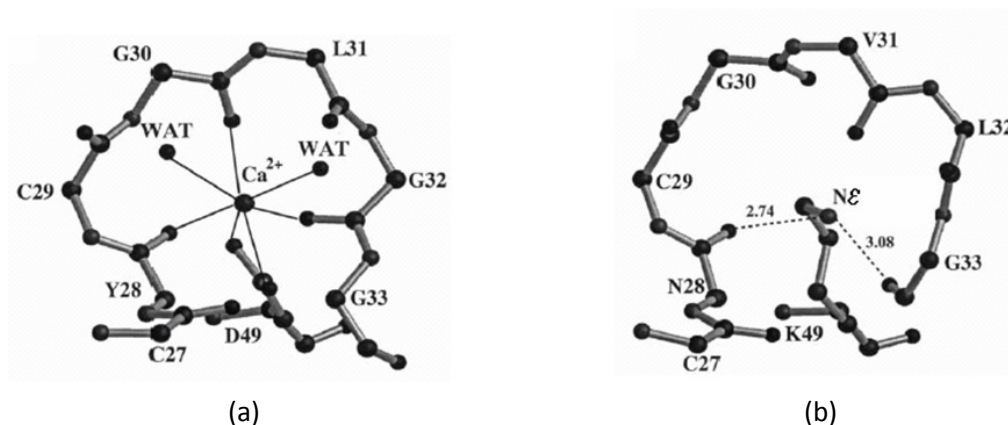


Figura 6: Esquema mostrando o envolvimento dos resíduos 27-33 e 49 que compreende a região de ligação com cálcio das PLA2s. (a) Região com Asp-49 de *Naja naja atra* ilustrando a coordenação bipirâmide pentagonal do íon cálcio. (b) mesma região, porém com Lys-49 da *Bothrops pirajai* onde o átomo Nε da cadeia lateral da lisina ocupa a posição do cálcio formando ligação de hidrogênio (Ward et al., 1998).

Devido o envolvimento do grupo II das sPLA no processo inflamatório, iniciaram-se pesquisas para desenvolver agentes farmacológicos capazes de inibir a atividade desta enzima e conseqüentemente controlar os estados inflamatórios (Gil et al., 1997). Desta forma, uma série de inibidores sintéticos e naturais vem sendo estudados para esse fim.

1.5 – INIBIDORES DE FOSFOLIPASES A2

No Brasil, o envenenamento causado por picadas de serpentes requer um tratamento médico e emergente, já que o único tratamento científico validado é o uso da soroterapia. Embora esse método apresente bons resultados, algumas desvantagens ainda estão presentes, tais como: 1) limitação ou falta de acesso em zonas rurais de países

desenvolvidos onde grande parte dos acidentes ocorre; 2) variações significativas na composição do veneno e reação antigênica devido a diversidade geográfica e taxonômica; 3) efeito limitado da soroterapia na proteção contra danos rápidos e locais (Soares et al., 2005). Buscando suprir as desvantagens ainda presentes no soro antiofídico, uma série de estudos visando possíveis inibidores para PLA2 vem sendo desenvolvidos, dentre eles moléculas sintéticas e naturais tanto de origem animal como vegetal (Borges et al., 2001)

A heparina de baixo peso molecular, um polissacarídeo aniônico natural mostrou-se eficiente na inibição parcial das atividades miotóxica, citotóxica e edematogênica induzidas pela miotoxina de *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi* e bloqueou totalmente o efeito neurotóxico induzido pela última (Soares et al., 2001; Stábeli et al., 2006). Outro inibidor de PLA2 bastante estudado é o brometo de p-bromofenacila (pBPB).

Nas últimas décadas muitos estudos vêm sendo realizados com PLA2 quimicamente modificada com pBPB para melhor entender a relação estrutura-função, já que esse composto se liga na His-48 da proteína (Zhao et al., 1998; Andrião-Escarco et al., 2000). His-48 é um resíduo altamente conservado em PLA2s devido sua importância no mecanismo catalítico da proteína. Alquilação nesse resíduo resulta em uma inibição na atividade catalítica da PLA2, além de modificações nas atividades farmacológicas (Marchi-Salvador et al., 2009). Andrião-Escarco e colaboradores (2000) mostraram que após tratamento químico com pBPB, bothropstoxinas de *Bothrops jararacussu* tiveram diminuições significativas nas atividades miotóxicas, citotóxicas e edematogênica, além de abolir quase completamente a atividade catalítica. As mesmas alterações farmacológicas foram observadas em Lys49-PLA2 de *B. asper* e *B. pirajai* após tratamento químico com pBPB (Diaz et al., 1993; Toyama et al., 1998), sugerindo que miotoxinas Lys49 e Asp49

podem romper bicamadas fosfolípídicas independentemente de sua ação catalítica (Soares e Giglio, 2003).

Além desses inibidores, muitas substâncias extraídas de plantas têm demonstrado ação antiofídica, mostrando que essas biomoléculas são capazes de inibir total ou parcialmente diversas ações sistêmicas e/ou locais causadas pelo envenenamento. Desta forma, o número de estudos com objetivo de isolar esses compostos vem aumentando nos últimos anos (Mors et al., 2000; Samy et al., 2008), com grande destaque aos metabólitos especiais de plantas.

1.5.1– METABÓLITOS ESPECIAIS DE PLANTAS

Metabólitos especiais de plantas são grupos de diversas moléculas que estão envolvidas na adaptação da planta com o meio, e fazem parte dos processos bioquímicos, do crescimento celular e da reprodução. Existem em torno de 24.000 estruturas, incluindo muitos compostos que possuem efeitos tóxicos e antinutricionais em mamíferos. Os metabólitos especiais de plantas são classificados de acordo com suas vias biossintéticas. Três famílias de moléculas são geralmente consideradas: fenólicos, terpenos, esteróides e alcalóides (Bourgaud, et al., 2001). Dentre eles, encontram-se em plantas inibidores de proteases tais como, lectinas, alcalóides, saponinas e taninos. Estes compostos estão envolvidos na defesa contra herbívoros e patógenos, regulação de simbiose, controle de sementes germinativas e inibição química de algumas espécies de plantas competidoras (alopatia) (Makkar et al., 2007).

Devido à grande diversidade de efeitos, dentre eles efeitos antioxidantes, antiviral, antibacterianos, antifúngicos e anticâncer, o interesse nesses metabólitos de plantas tem

aumentado nos últimos anos nas indústrias para produção de fármacos e cosméticos (Bourgaud et al., 2001; Makkar et al., 2007).

1.5.1.1– Flavonóides

Flavonóides são substâncias naturais encontradas abundantemente na natureza, são formados em plantas a partir da fenilalanina, tirosina e malonato. A estrutura básica de um flavonóide é um núcleo *flavan* que consiste em 15 átomos de carbono arranjado em três anéis (C6-C3-C6) (Figura 7). As várias classes dos flavonóides diferem no nível de oxidação e padrão de substituição no anel C, enquanto outros no padrão de substituição dos anéis A e B (Di Carlo et al., 1999; Pietta, 2000)

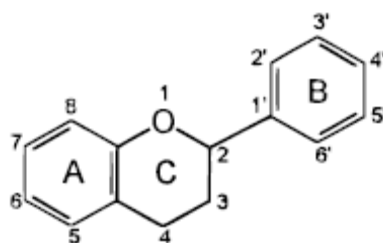


Figura 7: Estrutura química do flavonóide (Pietta, 1999).

Os flavonóides participam de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa dos vegetais contra o ataque de patógenos e suas principais fontes envolvem frutos (uvas, cerejas, maçã, groselhas, frutas cítricas entre outros) e hortaliças (pimenta, tomate, espinafre, dentre outros). São subdivididos nas principais classes: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonóides (Dornas et al., 2008).

Os flavonóides também são conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Devido essas características são largamente usados em cosméticos e na indústria farmacêutica (Kim et al., 2001). A capacidade antioxidante desses compostos é determinada por sua estrutura, em particular por hidroxilas que podem doar elétrons e suportar a deslocalização em torno do sistema aromático. Outro determinante estrutural importante para a capacidade antioxidante dos flavonóides é atribuído às hidroxilas em C4 e C3, que podem atuar aumentando o potencial antioxidante (Dornas et al., 2008), e, além disso, estudos indicam que agliconas, incluindo quercetina, luteolina, miricetina e canferol têm grande capacidade antioxidante, maior que de flavonóides conjugados, como a quercetina-3-glicosídica, quercetina e rutina (Noroozi et al., 1998).

Um número de flavonóides possui atividade antiinflamatória e alguns deles podem agir como fracos inibidores de PLA2 (Gil et al., 1997).

A relação das sPLA2 em processos inflamatórios aumentou o interesse por substâncias farmacologicamente ativas que conseguem inibir a atividade da toxina. Em particular, a ocorrência de vários tipos de sPLA2 atraiu a atenção para a importância de se descobrir inibidores seletivos e específicos para os diferentes tipos da enzima. Recentemente foi descoberto (Gil et al., 1994; Lindahl e Tageson, 1993) que vários flavonóides inibem seletivamente a sPLA2-II e conseqüentemente podem ser utilizados para discriminar entre diferentes tipos de sPLA2 em materiais biológicos.

As descobertas indicam também que os grupos hidroxilas nas posições 3' e 4' do anel B e 6 e 7 do anel C possuem papel importante nos mecanismos de inibição seletiva da sPLA2-II. Dessa forma, pode-se assumir que os diferentes flavonóides possuem

mecanismos de inibição diferentes para cada grupo de sPLA2. Em estudos realizados por Kim (2001) descobriu-se que os flavonóides também interagem com as cPLA2.

A quercetina (3,3',4',5,7- pentahidroxiflavona (Figura 8) é um dos mais comuns compostos fenólicos encontrados em plantas, e está muito presente na alimentação humana, sendo encontrada em muitas frutas, vegetais, chás e vinhos (Bjeldanes e Chang, 1977; Yang et al., 2000). Esse flavonóide apresenta uma série de efeitos sob células. Como antioxidante previne a oxidação de lipoproteínas com baixa densidade, apresenta efeitos antitumorais em células de animais *in vitro* e possui também efeitos antiinflamatório regulando a liberação de óxido nítrico e TNF- α (Manach et al., 1998; Tang et al., 2009).

Devido essas propriedades da quercetina, esse flavonóide foi escolhido para avaliar o seu efeito sob a atividade catalítica e farmacológicas de sPLA2.

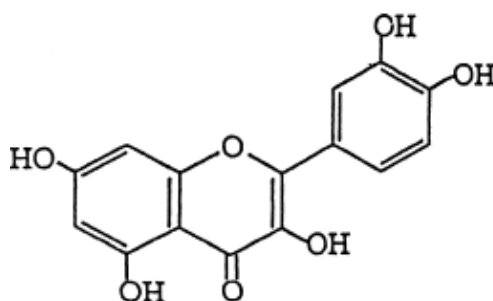


Figura 8: Estrutura da química da quercetina (Ishii et al., 2003).

1.5.1.2– Saponinas e Sapogeninas esteriodal

Saponinas (do latim sapon = sabão) a um grupo de glicoconjugados que se dissolvem na água e diminuem sua tensão superficial de modo que, ao se agitar suas soluções, forma-se uma espuma abundante e relativamente estável. São largamente encontradas no reino

vegetal e em alguns animais marinhos como peixe estrela e pepino do mar (Güçlü-Üstündag e Mazza, 2007).

A estrutura das saponinas (Figura 9) consiste em uma porção oligossacarídea formada por carboidratos como glicose, galactose, N-acetilglucosamina, ácido glicurônico, xilose, ramnose ou metilpentose ligada a uma porção aglicona (não-açúcar), insolúvel em água, chamada genericamente de sapogenina e quando esta possui um esqueleto esteroidal, ela é chamada de sapogenina esteroidal. Portanto, sapogenina é a porção não-polar de uma saponina. O oligossacarídeo nas saponinas está ligado normalmente na posição C-3, mas muitos o apresentam ligado no C - 6, 7, 15, 16, 24, e 26. A porção sacarídea pode ser linear ou ramificada, contendo de 2 a 5 resíduos monossacarídeos (Williams e Gong, 2007).

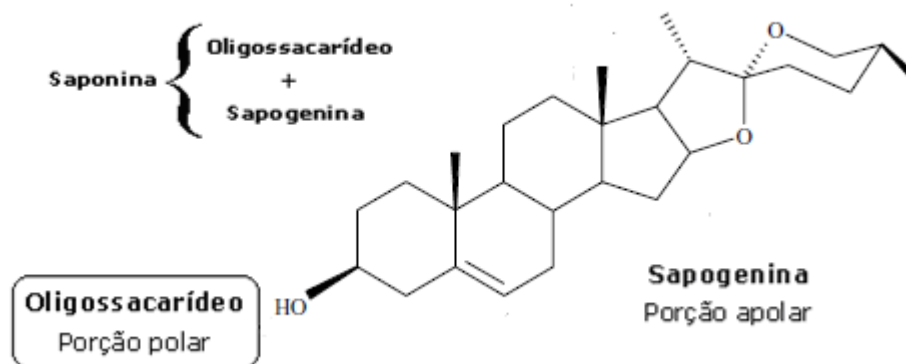


Figura 9: Estrutura química de uma saponina esteroidal (Güçlü-Üstündag e Mazza, 2007 - modificado).

Por muitos anos as sapogeninas esteroidais tem sido utilizadas na indústria farmacêutica para a síntese de hormônios adrenocorticóides, análogos da vitamina D e de drogas com ação anti-inflamatórias (Pérez-Dias, 2010). Dentre as sapogeninas esteroidais, as mais conhecidas são: diosgenina e hecogenina.

A diosgenina, encontrada em raízes de inhame selvagem, é comumente usada como um ingrediente na preparação de muitas drogas esteroidais, hormônios sexuais e pílulas anticoncepcionais orais fornecendo cerca de 50% do material bruto para a produção de cortisona, progesterona e muitos outros hormônios esteroidais (Narula et al., 2007)

Os efeitos antiinflamatórios e estrogênicos da diosgenina foram previamente hipotetizados devido à similaridade estrutural da molécula ao estrogênio. A diosgenina mostrou ser útil para a manutenção de níveis saudáveis de colesterol no sangue e impediu significativamente a perda óssea na mesma extensão que o estrogênio, indicando que ela pode ser utilizada para reduzir a progressão da osteoporose (Yen et al., 2005). Outra possível aplicação da diosgenina é no tratamento de tumores já que ela é uma forte indutora de apoptose das células cancerosas (Corbère et al., 2004).

A hecogenina (CR01) (Figura 10) é uma sapogenina extraída de *Agave sp*, uma planta nativa do México encontrada no sul dos Estados Unidos e na América Latina (Ghoghari e Rajani, 2006). Embora de forma menos acentuada que a diosgenina, essa sapogenina também apresenta propriedades antiproliferativas e pró-apoptóticas em determinados tipos de linhagens de células cancerosas (Corbiere et al., 2003; Trouillas et al., 2005).

A hecogenina é um dos mais importantes precursores para a síntese de hormônios adrenocorticóides, dentre eles, cortisol, prednisolona, predisona, dexametasona e betametasona (Ghoghari e Rajani, 2006). Até o momento, na literatura não se encontra nenhuma informação envolvendo o uso de sapogeninas como inibidores de PLA2s.

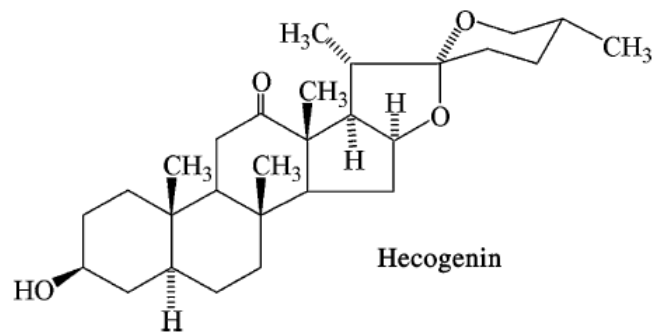


Figura 10: Estrutura química da hecogenina – CR01 (Ghoghari e Rajani, 2006)

2 – OBJETIVOS

2.1 Gerais

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de da quercetina e hecogenina sob as atividades enzimática e farmacológicas de sPLA2 purificadas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops pirajai*.

2.2 – Específicos

- Isolar e caracterizar bioquimicamente sPLA2 do veneno de duas serpentes.
- Pré-incubar as sPLA2 com os seguintes compostos: quercetina e hecogenina (CR01).
- Analisar o efeito da sPLA2 nativa e sPLA2 modificada quimicamente através de: dicroísmo circular; fluorescência intrínseca; espectrometria de massas; atividade enzimática; atividade edematogênica; atividade miotóxica.
- Avaliar modificações nas atividades de formação de edema e miotóxica da sPLA2 na condição de co-incubação com três concentrações diferentes dos inibidores.
- Estudo de docking para investigar possíveis mecanismos de ação da quercetina sobre ação da sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus*

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais:

Os animais utilizados nos ensaios farmacológicos foram camundongos Swiss fêmeas (18-20g) a partir de quatro semanas, adquiridos junto ao Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB-UNICAMP). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas, sob o número 1916-1.

3.2 Reagentes, Materiais:

Os venenos foram adquiridos junto ao CETA (Centro de Extração de Toxinas Animais, Morungaba, São Paulo), Bio-Agents Serpentarium (Batatais, São Paulo, Brazil) e do Instituto Butantã. Todos os solventes, produtos químicos e reagentes utilizados neste projeto foram de grau HPLC, grau sequência ou de alto grau de pureza, obtidos dos laboratórios Sigma, Aldrich Chemicals, Merck, Cristália e Bio Rad. Hecogenina (CR01) foi adquirida junto ao Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

3.3 Purificação do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops pirajai*

3.3.1 Purificação da sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus*:

Para purificação da sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus* partiram-se de 10,0 mg de veneno bruto solubilizados em 200 µL de uma solução de bicarbonato de amônio (AMBIC) 1,0 M. A solução foi centrifugada e o sobrenadante injetado na coluna de fase reversa acoplada a um sistema de HPLC de acordo com as seguintes condições:

- Soluções: A- Água + TFA 0,1%
B- 66,6% de ACN em solvente A
- Gradiente: 0 – 05 min: 0% B
05 – 16 min: 40% B
16 – 46 min: 60% B
46 – 47 min: 100%B
- Coluna: C5 (25cm x 10mm, 10µm Supelco)
- Fluxo: 1,0 mL/min.
- Comprimento de Onda: 280 nm.

3.3.2 Purificação por troca iônica da sPLA2 de *Bothrops pirajai*:

A purificação da sPLA2 de *Bothrops pirajai* teve como objetivo a separação da PLA2 básica e a obtenção de uma mistura proteica com caráter ácido. Para isso foi utilizada uma coluna catiônica CM-5PW acoplada a um sistema de HPLC com troca iônica previamente equilibrada com solvente A. Partiram-se de 10,0 mg de veneno bruto solubilizados em 200 µL solução A, a solução de veneno foi centrifugada e o sobrenadante aplicado no sistema. A fração ácida, eluída no início da corrida, foi coletada separadamente das outras frações. As condições utilizadas para a purificação estão a seguir:

- Soluções: A- 0,05M de AMBIC
B- 1,0M de AMBIC
- Gradiente: 0 – 10 min: 0% B
10 – 11 min: 20% B
11 – 40 min: 100% B
- Coluna: TSKgel CM-5PW (7,5mm ID x 7,5cm L Tosoh Bioscience)
- Fluxo: 1,0 mL/min.
- Comprimento de Onda: 280nm.

3.3.3 Purificação por fase reversa da sPLA2 de *Bothrops pirajai*:

Para purificação da sPLA2 de *Bothrops pirajai* partiu-se de 10,0 mg do veneno resultante da purificação por troca iônica. O veneno foi solubilizado em 200 µL de uma solução de bicarbonato de amônio (AMBIC) 1,0 M, centrifugado e o sobrenadante injetado em uma coluna de fase reversa previamente equilibrada com solução A acoplada a um sistema de HPLC de acordo com as seguintes condições:

- Soluções: A- Água + TFA 0,1%
B- 66,6% de ACN em solvente A
- Gradiente: 0 – 02 min: 0% B
02 – 05 min: 20% B
05 – 30 min: 100% B
- Coluna: C5 (25cm x 10mm, 10µm Supelco)
- Fluxo: 1,0 mL/min.
- Comprimento de Onda: 280 nm.

3.3.4 Tratamento químico das sPLA2 com quercetina e hecogenina :

O tratamento químico das sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus* e de *Bothrops pirajai* foi realizado de acordo com o método de Zhao et al., (1998). Desta forma 400µL de uma solução de sPLA2 de 3 mg/mL foi misturado com 3,6 µL de uma solução de EDTA 0,9 mM. Um volume de 400 µL de uma solução de 0,1 mM dos compostos (quercetina ou sapogenina) em dimetil-sulfóxido (DMSO) também foi adicionado. A mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente por 90 minutos e o precipitado formado foi removido por centrifugação. O sobrenadante foi injetado em uma coluna C5 (5cm x 10mm, 10µm Supelco) acoplada a um sistema de HPLC, com os seguintes solventes: Água com 0,1% de TFA (Solvente A) e 66,6% de ACN em solvente A (solvente B). Os sais e outros contaminantes foram eluídos no início da corrida com 0% de solvente B.

3.4 Caracterização Bioquímica

3.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com o manual técnico de eletroforese de proteína da Amershan Bioscience. O gel de corrida (running gel) de 12,5% foi preparado utilizando uma solução stock de poliacrilamida, tampão Tris-HCl 1,0M pH 8,8, solução de 20% de SDS, solução de persulfato de amônio de 10% e TEMED. O stacking gel de 5% foi preparado usando os mesmo reagentes, porém usou-se tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8.

A corrida de eletroforese foi realizada em um sistema duplo de mini placas SE 250 Mighty Small (Hoefer Scientific Instruments) com uma voltagem constante de 60 V para o Stacking gel e 90 V para o running gel. As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra (Tris-HCl, 0,075M, pH 6,8; 10% de glicerol; 4% de SDS e 0,001% de azul de bromofenol) e aquecidas a uma temperatura de 100°C por 5 minutos em banho maria. Após a corrida, os géis foram corados com solução de Comassie Blue R250 0,1%, água: metanol: ácido acético glacial (5:5:2) a 37°C e o excesso de corante foi removido com água: metanol: ácido acético glacial (5:5:2 v/v).

3.5 Análises espectroscópicas

3.5.1 Atividade Enzimática das sPLA2:

A atividade enzimática de sPLA2 é avaliada usando o ácido 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzóico – 4N3OBA, um substrato cromogênico. O primeiro relato desse substrato foi por Cho e Kezdy em 1991 e desde então vem sendo usado para avaliar a atividade de PLA2 de serpentes e de soro humano (Petrovic et al., 2001).

A reação de PLA2 com 4N3OBA (Figura 11) é caracterizada pela hidrólise da ligação éster do substrato pela PLA2 levando a conversão do cromóforo ácido 4-Nitro-3-hidroxi benzóico, que pode ser medido no comprimento de onda de 425nm (Petrovic et al., 2001).

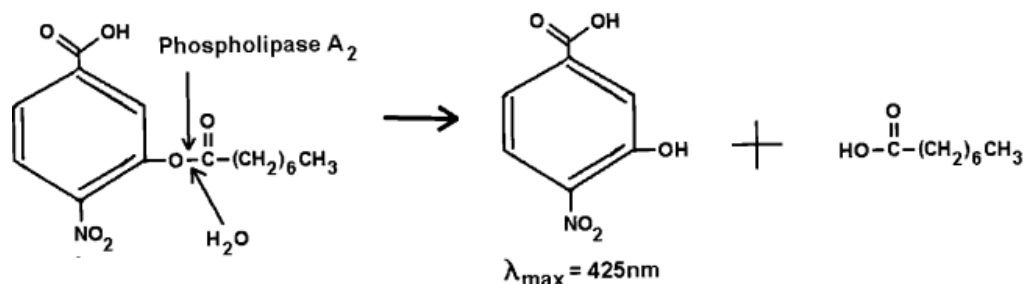


Figura 11: Estrutura do substrato de PLA2, ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico e do cromóforo 4-Nitro-3hidroxi benzóico (Petrovic et al., 2001).

Os ensaios enzimáticos das sPLA2 nativa, das sPLA2 incubadas previamente com os compostos químicos e das sPLA2 co-incubadas foram realizados de acordo com o método de Holzer & Mackessy (1996) adaptado para placa de ELISA. Desta forma foi adicionado em cada poço 200 μ L de tampão (Tris-HCl 0,01M; CaCl_2 0,01M; NaCl 0,1M pH 7,8), 40 μ L de substrato NOBA, (4-nitro-3octanoyloxy-benzóico) na concentração de 1,0mg/mL em acetonitrila e 20 μ L de amostra com concentração de 1mg/mL. A leitura dos poços foi feita a 425 nm em um leitor de placa de multicanal (Spectramax 340) em intervalos de 5 minutos durante 40 minutos com a temperatura constante de 37°C. Para as amostras co-incubadas, a concentração dos compostos polifenólicos variou entre 5 μ g a 90 μ g.

3.5.2 Dicroísmo circular (CD)

Dicroísmo circular é uma técnica espectroscópica largamente utilizada para avaliar conformação e estabilidade de proteínas em diferentes condições, como temperatura, força

iônica e presença de solutos ou moléculas pequenas. Dentre as vantagens acopladas a essa técnica pode-se destacar a necessidade de baixas concentrações de amostras (1-10 mg/mL), além de ser uma técnica não destrutiva e relativamente fácil de operar (Corrêa e Ramos, 2009).

As proteínas de um modo geral apresentam regiões com arranjos helicoidais intercaladas com regiões menos estruturadas na constituição de sua estrutura secundária. Para uma molécula apresentar bandas de CD, deve apresentar quiralidade local ou global (Mulkerrin, 1996). A quiralidade da molécula pode ser estudada por dois métodos. Um é a polarimetria, no qual a amostra é analisada por uma luz monocromática polarizada linearmente. Amostras opticamente ativas giram o plano da luz e o ângulo formado na rotação (em miligraus) é medido. O segundo é o dicroísmo circular no qual uma luz polarizada tanto à esquerda quanto à direita passa através da amostra e a diferença de absorção dos componentes da esquerda e da direita são medidos ($\Delta A = A_E - A_D$). Uma amostra opticamente ativa vai absorver diferentemente a luz polarizada circularmente para a esquerda e para a direita obedecerá à lei de Lambert-beer (Corrêa e Ramos, 2009).

Para proteínas, os resultados de CD são apresentados normalmente na forma de elipticidade molar por resíduo $[\theta]$ ($\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$). Esse valor é obtido a partir da seguinte relação:

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times M}{C \times l \times n}$$

Em que θ é o valor da elipticidade obtido descontando o valor do tampão; 100 é um fator de conversão; M massa molar da proteína (kDa); C concentração da proteína

(mg/mL), l caminho óptico da cubeta (cm) e n número de resíduos de aminoácidos (Kelly e Price, 2000; Corrêa e Ramos, 2009).

Espectros de CD de proteínas são assimétricos devido às ligações peptídicas e moléculas sem um plano de simetria apresentam fenômeno de dicroísmo circular. O cromóforo amida da ligação peptídica aparece em grandes quantidades no espectro de CD abaixo de 250 nm. Grupos amidas possuem duas transições eletrônicas de baixa energia que são caracterizadas com transição $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi_0 \rightarrow \pi^*$ mostrando dicroísmo circular em 215-230 nm e 185-200 nm respectivamente. A transição $n \rightarrow \pi^*$ é eletricamente proibida, mas magneticamente permitida, sendo responsável pela banda negativa em 222 nm característica do espectro de α -hélice e pela banda negativa 216-218 nm característica do espectro de folha- β . A transição $\pi_0 \rightarrow \pi^*$ é responsável pela banda positiva em 190 nm e pela banda negativa em 208 nm característica do espectro α -hélice e pela banda positiva em 198 nm, característica do espectro de folha- β (Corrêa e Ramos, 2009).

sPLA2 pura e sPLA2 tratadas com os compostos foram solubilizadas em água e a concentração final da proteína foi ajustada para 15 μ M. As amostras foram transferidas para uma cubeta de quartzo de 0,1cm. O espectro de dicroísmo circular foi medido no intervalo de comprimento de onda de 195–296 nm em um J-715 espectropolaróide (Jasco Corp., Japan) com fenda de 1 nm e um tempo de resposta de 4 s. A coleta de dados foi realizada à temperatura de 20°C, com velocidade de scan de 50 nm/min. Vinte scans foram obtidos para cada amostra e todos os espectros foram corrigidos pela subtração do tampão branco.

3.5.3 Estudos de estabilidade térmica

A espectroscopia de dicroísmo circular também é largamente usada para verificar estabilidade proteica através de condições desnaturantes tais como alterações na temperatura, adição de químicos com a uréia e guanidina e mudanças no pH. Esse processo ocorre porque o desnaturante diminui a estabilidade da proteína e essa conseqüentemente começa a desenovelar perdendo sua estrutura. Esse processo é facilmente visível já que o espectro de random-coil é bem diferente dos espectros da proteína enovelada (Figura 12) (Corrêa e Ramos, 2009).

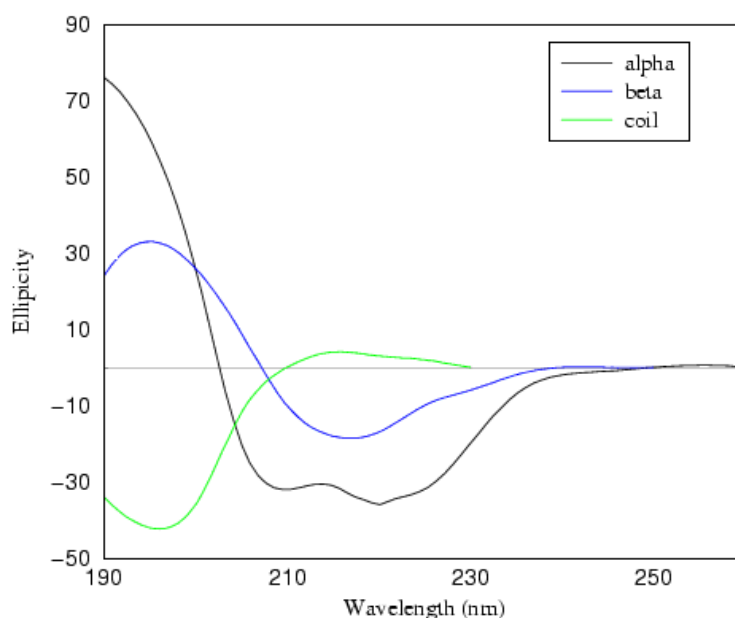


Figura 12: Perfil dos espectros de CD para α -hélices, folhas- β e estrutura random coil (Nottingham University).

A desnaturação da proteína pode ser determinada escolhendo um comprimento de onda específico em que há diferença no sinal da proteína enovelada e desenovelada. Para proteínas com presença de α -hélice um bom comprimento de onda é de 222 nm, já que nessa condição a proteína possui um alto sinal de CD e quase nenhum quando a proteína está desenovelada (Corrêa e Ramos, 2009).

Análises de estabilidade para verificar alterações na estrutura secundária pelo sinal de CD em função do aumento da temperatura, foram realizadas com a sPLA2 nativa e as sPLA2 tratadas quimicamente. Assim, amostras das proteínas com concentração de 15 μ M foram aquecidas de 20°C a 90°C, com velocidade de 1°C por minuto, com comprimento de onda constante de 222 nm. O equipamento usado foi um espectropolaróide J-715 Jasco.

Ao final as amostras foram resfriadas a temperatura de 20°C e um novo scan de dicroísmo foi realizado.

3.5.4 Fluorescência Intrínseca

A espectroscopia de fluorescência é uma das principais técnicas atualmente empregada em estudos com proteínas e peptídeos, especificamente em análises estruturais, conformacionais e de interações com outros tipos de estruturas moleculares (D'Auria, 2003). Essa técnica baseia-se na propriedade de certos grupos químicos, denominados cromóforos, de absorver e emitir radiação eletromagnética (Vivian e Callis, 2001). Um grupo cromóforo absorve radiação eletromagnética através de um processo mecânico e quântico, onde o mesmo é transformado de um estado fundamental para um estado excitado. A energia proveniente do fóton de luz absorvido corresponde à diferença de energia entre esses dois estados. A restituição de uma fração desta energia absorvida, ou seja, a emissão de fótons a partir do estado eletronicamente excitado denomina-se luminescência, que pode ser dividido em dois tipos, fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado fundamental e excitado (Lichtman e Conchello 2005). A absorção e emissão de luz são bem ilustradas pelo diagrama de nível de energia sugerido por A. Jablonski em 1935. Os estados fundamentais, primeiro e segundo níveis, são

descritos como S0, S1 e S2 respectivamente (Figura 13). Associado a cada estado eletrônico, está uma série de estados vibracionais (0, 1, 2, etc.) que correspondem às diferentes energias vibracionais das moléculas. À temperatura ambiente, a maioria das moléculas permanece no nível vibracional mais baixo do estado fundamental, ou seja, S0 (0).

A absorção de um fóton por uma molécula ocorre usualmente para um dos níveis vibracionais do estado excitado denominado singlete de modo que o espectro de absorção molecular representa a diferença de energia entre o estado fundamental (S0) e os diversos níveis vibracionais dos estados excitados singlete.

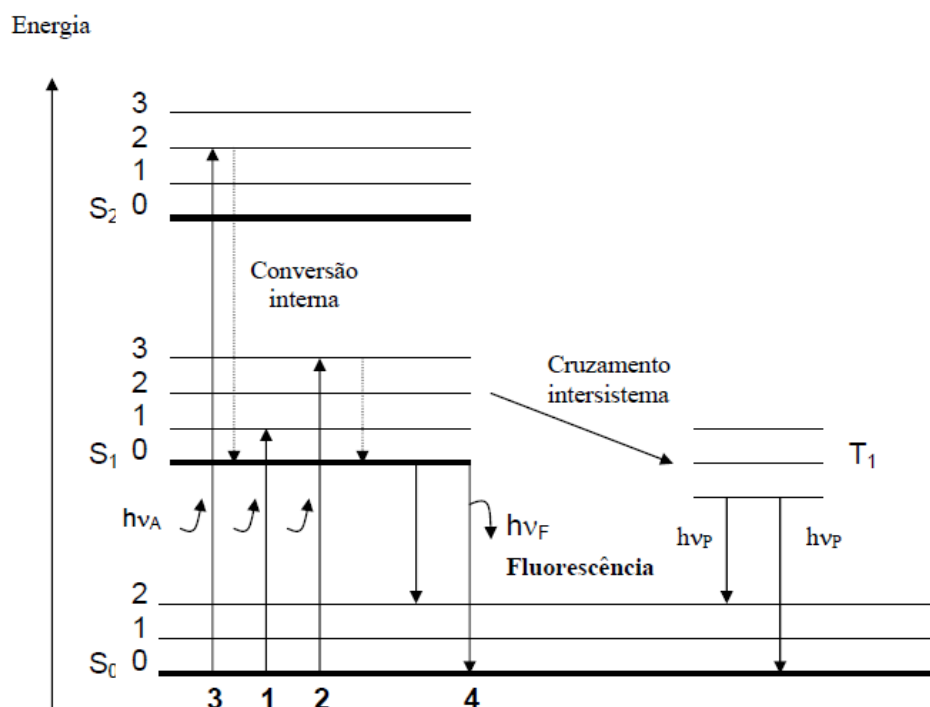


Figura 13: Diagrama de Jablonski ($h\nu_A$ é a energia de absorção ou excitação, $h\nu_F$ é a energia de fluorescência e $h\nu_P$ é a energia de fosforescência) (Lakowics, 1999-modificado).

Na fluorescência, o retorno dos elétrons para um dos vários níveis de energia vibracional ou rotacional de S0, ocorre pela emissão de um fóton de luz, o qual corresponde

à diferença de energia entre S1 (0) e um nível vibracional particular de S0 (transição 4 – Figura 13). Assim, da mesma maneira que a absorção de luz ocorre entre o estado vibracional inferior de S0 [S0(0)] e um dos diversos níveis vibracionais de S1, o processo de fluorescência ocorre a partir do S1(0) para qualquer um dos níveis vibracionais de S0. Neste caso, haverá um espectro de energia de fluorescência destes fótons, o qual é medido e representado por um espectrofotômetro de fluorescência.

A fluorescência intrínseca de proteínas é devido aos aminoácidos aromáticos tais como triptofano, tirosina e fenilalanina. O triptofano possui um anel indólico que é responsável pela absorção UV e emissão de proteínas. Tirosina possui características similares ao triptofano, entretanto, seu espectro de emissão é estreitamente mais distribuído na escala do comprimento de onda. Emissões de fenilalanina são observadas somente quando a proteína não possui triptofano e tirosina (Lakowicz, 1999).

A emissão do triptofano é altamente sensível ao meio em que se encontra a proteína, e devido a isso é muito utilizado como um grupo repórter para mudanças conformacionais das proteínas. Espectros de emissão de proteínas têm mostrado vários fenômenos, tais como: ligação de ligantes, associação proteína-proteína e desenovelamento protéico (Lakowics, 1999).

A intensidade de fluorescência de sPLA2 nativa e sPLA2 tratada quimicamente com os compostos foi monitorada com um Varian Cary Eclipse. As proteínas foram solubilizadas em água e as medidas foram realizadas usando uma cubeta de quartzo de 1cm com temperatura constante de 37°C. Para analisar a fluorescência de resíduos com o triptofano e tirosina, as amostras foram excitadas com comprimento de onda de 280 nm e a emissão foi medida em um intervalo de 300 a 450nm.

3.5.5 Espectrometria de massa

Uma das técnicas mais poderosas disponível em um laboratório de análise é a espectrometria de massas. Essa técnica permite a identificação de compostos pela formação de íons e com separação e detecção baseada na relação massa/carga (m/z) (Kicman et al., 2007).

O uso da espectrometria de massa para biomoléculas como proteínas e peptídeos iniciou-se na década de 90 com a chegada de duas técnicas de ionização: eletrospray e ionização por dessorção a laser induzida por matriz (MALDI). Ambas as técnicas possibilitam que as amostras sejam brandamente ionizadas permitindo que as moléculas permaneçam relativamente intactas durante o processo de ionização (Kicman et al., 2007).

A ionização por eletrospray pode ser feita no modo positivo ou negativo. No modo positivo a amostra é acidificada formando moléculas protonadas e seus contra-íons. Posteriormente, a solução é nebulizada através de um tubo capilar onde se aplica uma alta voltagem. Desse modo, os ânions presentes na solução serão neutralizados pelo capilar e as gotas formadas pela nebulização conterão excesso de cargas positivas (moléculas protonadas). O solvente presente nas gotículas é evaporado restando, assim, a molécula protonada na fase gasosa. Para ionização no modo negativo, usam-se uma solução básica e um potencial negativo no capilar para se produzir os íons negativos (Chaurand et al., 1999).

Na técnica de MALDI, a amostra é misturada com uma matriz (geralmente um ácido orgânico aromático) formando uma “mistura sólida”. Um pulso de laser, com comprimento de onda próximo do UV, incide sobre essa mistura e a energia do laser é absorvida pela matriz, que tem o máximo de absorção perto do comprimento de onda do laser. Desse modo, a matriz evapora e o analito que estava incluso na matriz, agora se encontra na fase

gasosa altamente energética. A formação dos íons (ionização) ocorre através da transferência de carga (ex: transferência de prótons) das moléculas da matriz para o composto que fica na forma de MH^+ . Os íons formados recebem uma alta energia cinética inicial (K) que os impulsiona para o analisador de massas Time-of-flight (TOF), onde são separados de acordo com o tempo de voo, considerando a distância na qual o íon se movimenta até atingir o detector. Íons mais leves chegam mais rapidamente no detector, enquanto os íons mais pesados demoram mais tempo (Chaurand et al., 1999).

A massa molecular de sPLA2 e sPLA2 tratada com quercetina (sPLA2:Q) de *Crotalus durissus terrificus* foram determinadas usando a técnica de MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight) em um Voyager-DE PRO MALDI-TOF (Applied Biosystems). 1 μ L de amostra com 0,1% de TFA foi misturado com 2 μ L da matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, 50% de acetonitrila. A matriz foi preparada com 30% de acetonitrila e 0,1% de TFA (v/v). Massas de íons foram determinadas com voltagem de aceleração de 25 kV, e o laser operado a 2890 μ J/cm², com 300ns de atraso e no modo linear.

3.6 Atividades Biológicas

3.6.1 Edema de Pata – inflamação

O ensaio farmacológico de edema de pata foi realizado em camundongos fêmeas Swiss (18-20g) (n=5). Para avaliar a indução do edema, foram testadas sPLA2 em três situações diferentes: 1) sPLA2 pura (1 μ g/1 μ L); 2) sPLA2 tratada previamente com quercetina e hecogenina e 3) sPLA2 co-incubadas com os compostos nas concentrações de 0,5 μ g/ μ L, 1,0 μ g/ μ L e 2,0 μ g/ μ L.

Na primeira etapa, foi testada a indução de edema por sPLA2 pura e sPLA2 incubada previamente com os compostos. Para isso, foi injetado na região subplantar, 25 µL de solução aquosa com 5% de DMSO (controle), 25 µL de sPLA2 pura (1µg/1µL) e 25 µL de sPLA2 incubada previamente com o composto (1µg/1µL). Na segunda etapa, a formação de edema foi avaliada na condição de co-incubação, para isso foram misturados 12,5 µL de sPLA2 (1µg/1µL) com 12,5 µL de água (controle) e 12,5 µL de sPLA2 com 12,5 µL dos compostos nas concentrações de 0,5 µg/µL, 1,0 µg/µL e 2,0 µg/µL. Imediatamente após a co-incubação, a mistura foi injetada na pata do camundongo. O volume das patas em todas as etapas foi medido nos intervalos de tempo de 15, 30, 60, 120, 180 e 360 minutos, utilizando um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália).

3.6.2 Creatina Quinase – miotoxicidade

A atividade da creatina quinase plasmática (CK) foi medida usando um kit de cinética CK-UV (Laborlab). Os ensaios foram realizados em duas etapas: 1) avaliação da quercetina e hecogenina na atividade da sPLA2 através de incubação prévia. Para isso, foi injetado no músculo gastrocnêmio de camundongos Swiss (n=5), 25 µL de solução aquosa com 5% de DMSO (controle), 25 µL de sPLA2 pura (1µg/1µL) e 25 µL de sPLA2 incubada previamente com o composto (1µg/1µL). 2) avaliação do efeito miotóxico através da co-incubação da quercetina e hecogenina com sPLA2 pura. Assim, 12,5 µL de sPLA2 (1µg/1µL) com 12,5 µL de água (controle) e 12,5 µL de sPLA2 com 12,5 µL dos compostos nas concentrações de 0,5 µg/µL, 1,0 µg/µL e 2,0 µg/µL foram testados. Em ambas as etapas, amostras de sangue foram coletadas da cauda em tubos capilares heparinizados e centrifugados para separação do plasma. A atividade de CK foi

determinada usando 4µL do plasma, de acordo com o manual de instrução do kit. A atividade foi expressa em U/L.

3.6.3 Agregação plaquetária.

A atividade de agregação plaquetária foi feita como descrita por Toyama et al. (2006). Voluntários saudáveis, que não tomaram medicamentos nos últimos 15 dias doaram sangue. O sangue foi colocado em tubos plásticos contendo 1:10 do volume final de ácido cítrico dextrose (ácido cítrico 3%, citrato trissódico 4%, glicose 2%; 1:9 v/v), e centrifugado a 200g por 15 minutos a 20°C para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). Para preparar as plaquetas lavadas, o PRP foi centrifugado a 800g por 12 minutos a 20°C na presença de tampão de lavagem (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, Citrato de sódio 12 mM, glucose 10 mM and sacarose 12 mM; pH 6; 5:7 v/v. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de plaquetas foi ressuspensionado em solução Krebs livre de Ca^{2+} (Radomski e Moncada, 1983).

A medida de agregação foi realizada usando-se um agregômetro de dois canais (Payton Scientific Instruments, Inc, Buffalo, NY). O PRP representa 0% de agregação, determinando-se uma linha de base para o aparelho que foi calibrado contra PL, que apresenta 100% de agregação, determinando-se um pico máximo. Com isso foi possível determinar uma amplitude para o registro de agregação deste plasma. A calibração foi realizada contra solução de Krebs (NaCl 118mM, NaHCO_3 25mM, D-glicose anidra 5,6mM e KCl 74g/L). Uma suspensão de PL (400 ul) foi mantida sob agitação constante (900 rpm) no agregômetro em cuvetas a 37°C. Os experimentos de agregação foram realizados em triplicatas, utilizando-se sPLA2 nativas, PLA2 modificada com os compostos

e sPLA2 co-incubadas com os compostos nas concentrações de (0,5 µg/µL, 1,0 µg/µL e 2,0 µg/µL).

O experimento de agregação plaquetária foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Faculdade de Ciências Médicas, sob o protocolo CAEE 0323.0.146.000-09.

3.7 Modelagem Molecular – Docking

A estrutura otimizada da quercetina foi inicialmente analisada usando o método AM1 (Dewar, 1985) implementado no programa BioMedCache (BioMedCache, 1989) com valores padrões para os critérios de convergência.

Os cálculos de docking foram realizados com o programa GOLD 4.0 (Jones, 1997) para obter a afinidade *in silico* da quercetina com relação à sPLA2. A estrutura foi tomada a partir do banco de dados de proteínas (PDB) sob o código 2QOG. Para os cálculos foi considerada a flexibilidade da quercetina e da sPLA2 a fim de representar o encaixe induzido gerado pela presença de um ligante não-ativo. Os resíduos Phe5, His48 e Asp49 foram configurados de uma maneira que as torções de suas cadeias laterais foram consideradas ativas durante os cálculos. O sítio ativo foi definido como todos os átomos dentro de um raio de 10.0 Å da histidina, que segundo o UniProt Data Bank (Swiss Prot.) é um resíduo importante. Além disso, os parâmetros para configuração do Genetic Algorithm (GA) usado no GOLD foram ajustados para dar a melhor solução com uma pesquisa mais alargada.

Os estudos de docking para sPLA2:Q de *Crotalus durissus terrificus* foram realizados em parceria com o Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas da Universidade Federal do Ceará (PE).

3.8 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão da média. As diferenças observadas foram determinadas por análise de variância, seguido pelo teste de Dunnett's quando vários grupos experimentais foram comparados com o grupo controle. O limite de confiança foi de 5%. Coeficiente de variabilidade foi calculado quando aplicável adotando valores menores que 10%.

4 – RESULTADOS

Crotalus durissus terrificus

4.1 Purificação da sPLA2.

Para a purificação da sPLA2 cataliticamente ativa isolada de *Crotalus durissus terrificus* foi utilizado somente a metodologia de CLAE em fase reversa. O veneno dessa serpente apresenta três isoformas de sPLA2 conhecidas como F15, F16 e F17, como mostrado na Figura 14(a). Para realização dos ensaios foi isolada a fração correspondente a isoforma F15. Após isolamento da fração correspondente a isoforma F15, um único pico pode ser observado Figura 14(b).

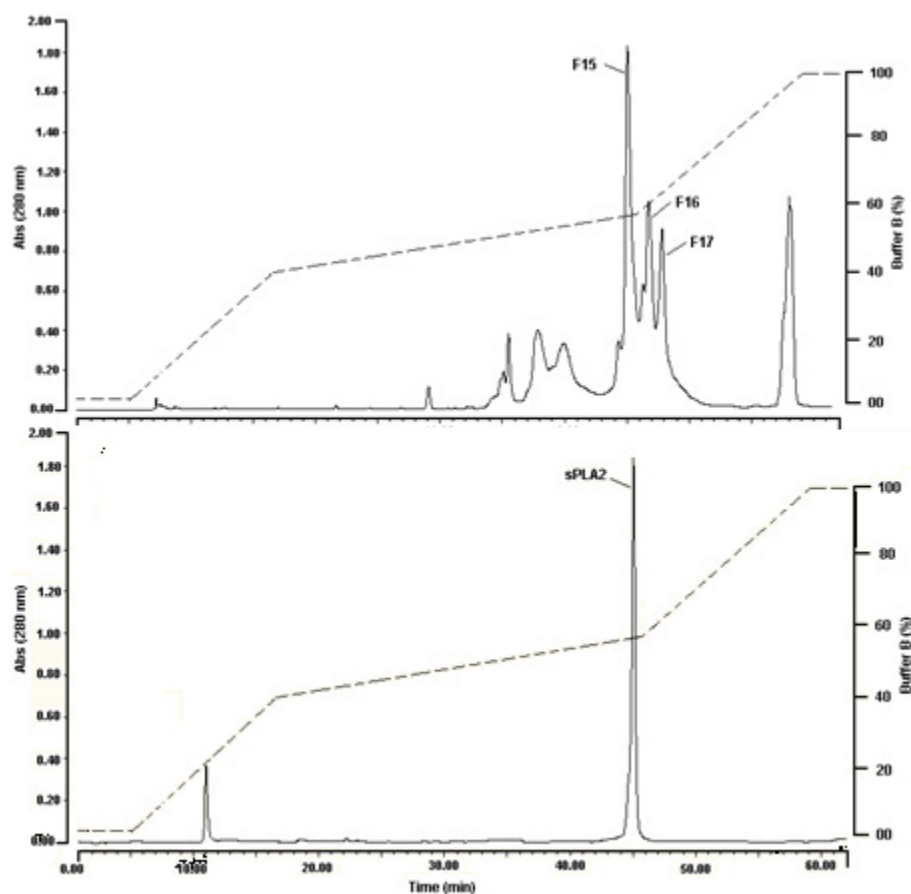


Figura 14: (a) Perfil cromatográfico do fracionamento do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* por CLAE em fase reversa; (b) Presença de um único pico correspondente a sPLA2 pura.

4.2 Quercetina

4.2.1 Tratamento químico– pré incubação.

Uma vez isolada a sPLA2 (F15), uma parte dessa enzima foi tratada com quercetina como descrito no item 3.3.4. Após o tempo de incubação da sPLA2 com a quercetina, a mistura resultante (sPLA2:Q) foi purificada novamente em uma coluna C5 de fase reversa utilizando as mesmas condições do fracionamento do veneno total. A Figura 15 mostra o perfil cromatográfico de eluição a sPLA2 tratada sobreposta com o perfil da sPLA2 nativa. O resultado apresentado mostra uma mudança no tempo de retenção após tratamento com quercetina

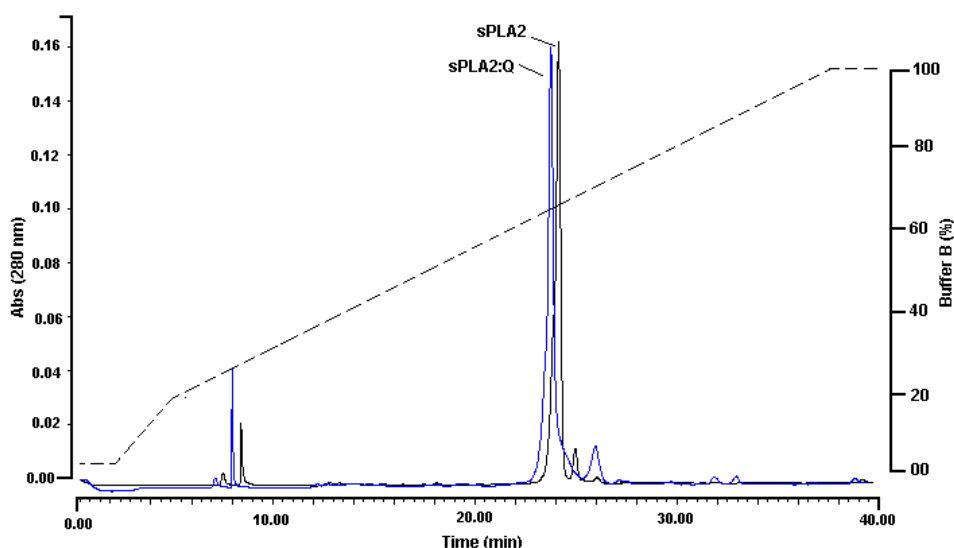


Figura 15: Perfil cromatográfico da sPLA2 nativa sobreposto com o perfil de sPLA2 previamente tratada com quercetina (sPLA2:Q)

4.2.2 Atividade Enzimática das sPLA2

Após o isolamento e tratamento químico com quercetina a sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus* foi testada a atividade enzimática da sPLA2 utilizando o 4N3OBA como substrato. Na Figura 16(a) pode se observar que o prévio tratamento de sPLA2 com

quercetina induziu uma forte diminuição na atividade enzimática. Para analisar em números a diminuição causada pela quercetina, foi plotado um gráfico de barras (Figura 16b) após 20 min. de reação. A velocidade de reação para sPLA2 nativa foi de $0,33 \pm 0,04$ mmoles/min, enquanto que para sPLA2 tratada com quercetina foi de $0,20 \pm 0,02$ mmoles/min, mostrando uma diminuição de 40 % da atividade enzimática.

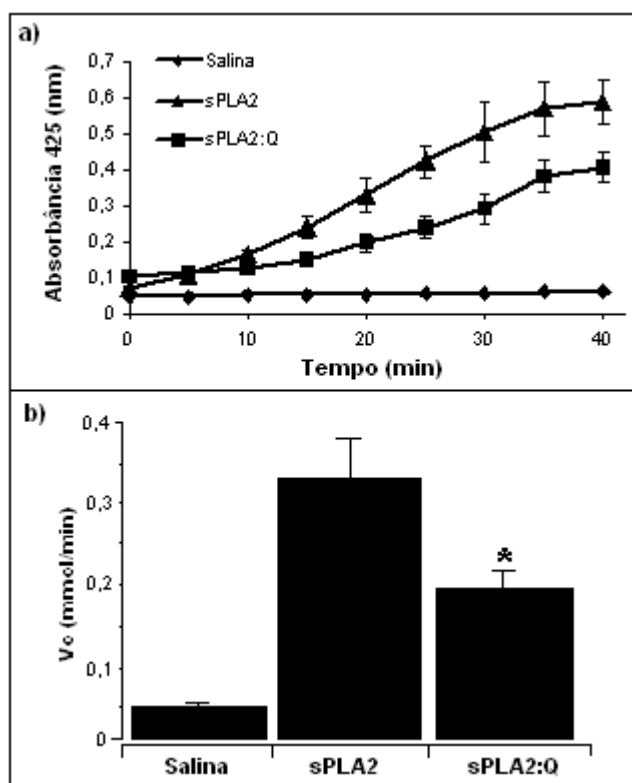


Figura 16: Ensaio enzimático sPLA2 e sPLA2:Q (a) atividade enzimática foi analisada usando 4N3OBA como substrato e monitorado com comprimento de onda de 425nm a 37°C. (b) atividade enzimática após 20 minutos de reação. Barras de erro indicam EPM *P<0,05 comparado com atividade da sPLA2 (n=5).

4.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil da massa molecular em PAGE-SDS, da fração de sPLA2 extraída do veneno de *Crotalus durissus terrificus* está mostrado na Figura 17. Como observado, as frações

apresentam somente uma banda e massa molecular de ~14 kDa, tanto em condições não reduzidas como em condições reduzidas com DTT. Esses resultados confirmam que as sPLA2 apresentam somente uma cadeia polipeptídica estando de acordo com os dados encontrados para outras sPLA2 descritas na literatura (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Arni e Ward, 1996; Toyama, 2003).

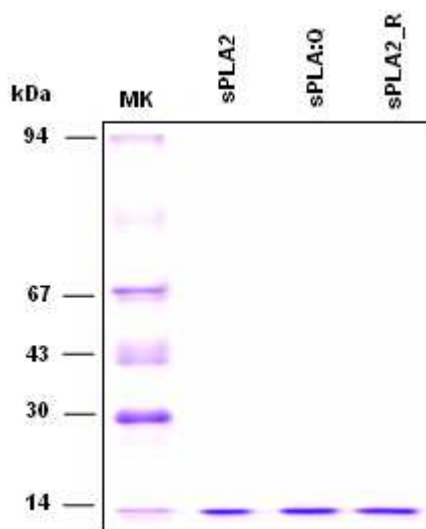


Figura 17: Perfil eletroforético das amostras de sPLA2 nativa e sPLA2:Q nas condições normais e reduzidas (sPLA2_R).

4.2.4 Dicroísmo Circular (CD)

As medidas de dicroísmo circular foram realizadas com o objetivo de verificar possíveis modificações em nível de estrutura secundária da sPLA2 causada pela interação da quercetina com a proteína. O perfil espectroscópico de CD da sPLA2 nativa e sPLA2:Q está representado na Figura 18.

A presença de bandas características de α -hélice na região próximas a 208 e 220 nm vão de encontro com os dados da literatura, já que é sabida a existência de três α -hélices na estrutura da sPLA2. Entretanto, foram observadas mudanças no espectro após tratamento

com quercetina, sugerindo que este composto causa modificações na estrutura secundária da sPLA2.

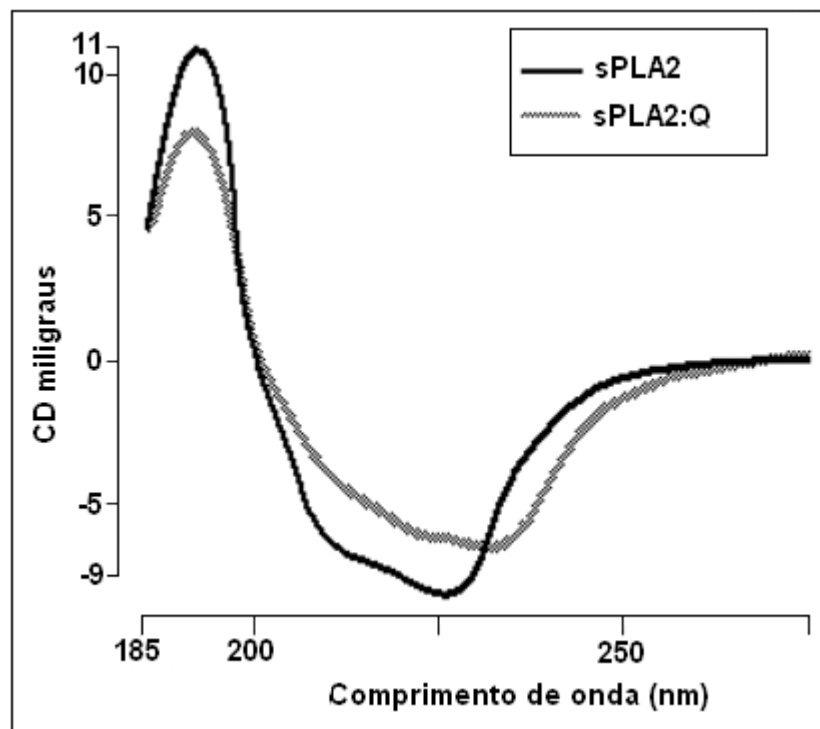


Figura 18: Perfil espectroscópico de dicroísmo circular de sPLA2 e sPLA2:Q em meio aquoso. A concentração de ambas as proteínas foi de 15 μ M.

4.2.5 Estudos de Estabilidade Térmica

Além da avaliação nas alterações em nível de estrutura secundária da sPLA2 nativa e sPLA2:Q, foram realizados também experimentos para verificar a estabilidade térmica das proteínas. O objetivo desse experimento é utilizar o aumento gradativo da temperatura e associar com possíveis eventos de desenovelamento protéico. Desta forma, as amostras foram aquecidas de 20°C a 90°C com comprimento de onda de 222 nm e, em seguida, foram resfriadas as condições iniciais. A Figura 19(a) mostra o espectro obtido durante o aquecimento e o resfriamento da sPLA2 e figura 19(b) o espectro de sPLA2 e sPLA:Q durante o aquecimento.

De acordo com o resultado obtido (Figura 19a), pode-se observar grande estabilidade da sPLA2, pois mesmo a uma temperatura (90°C) a proteína não perdeu completamente sua estrutura. Esse fato está diretamente relacionado com existência de 7-8 ligações dissulfeto da proteína que atribui uma forte estabilidade a mesma e possibilita um retorno a sua forma inicial após o resfriamento. Espectros de CD foram realizados após os ensaios de estabilidade, porém nenhuma modificação foi observada, mostrando que a conformação da proteína se manteve a mesma. Na Figura 19(b) pode se observar que não houve modificações estruturais durante o aquecimento de sPLA2 após tratamento com a quercetina. O fato de quercetina não alterar a estabilidade térmica da sPLA2 indica que interações ou ligações desse composto com a proteína não interferem nas ligações de dissulfeto, permitindo que sPLA2 mantenha sua estrutura.

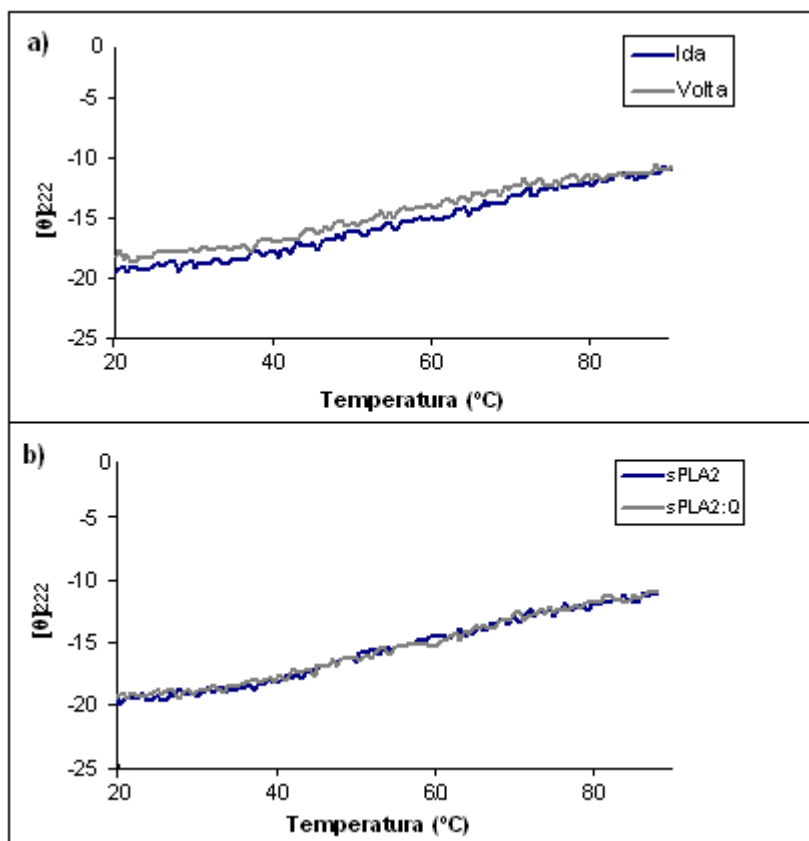


Figura 19: Espectros de estabilidade em função de variações na temperatura. (a) aquecimento (ida) e resfriamento (volta) da proteína nativa. (b) aquecimento de sPLA2 e sPLA2:Q

4.2.6 Fluorescência Intrínseca

Devido às informações que a técnica de fluorescência pode fornecer, principalmente em relação ao monitoramento de fluorescência intrínseca do triptofano, escolheu-se essa técnica para avaliar mudanças na estrutura proteica de sPLA2 causada pela interações com a quercetina. A Figura 20 mostra o espectro de fluorescência de sPLA2, sPLA2:Q e quercetina nas mesmas condições.

Comparando os espectros, pode-se observar uma maior intensidade na fluorescência do sPLA2 modificada quimicamente pela quercetina. Entretanto o espectro da quercetina mostra um pico de fluorescência próximo a região do triptofano, sugerindo que o aumento

da fluorescência total da proteína pode ser causado devido a ligação da quercetina com a proteína.

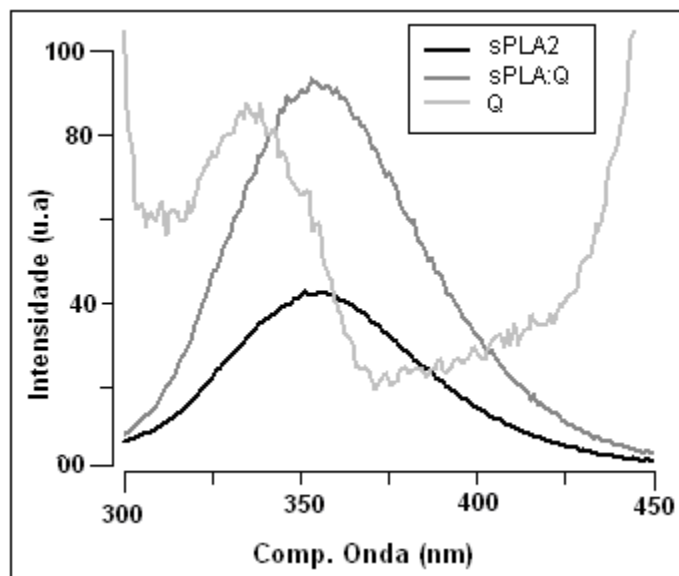


Figura 20: Espectro de emissão de fluorescência de sPLA2 e sPLA2:Q, á 52 μ M em água. Excitação de 280 nm e emissão de 350 nm.

4.2.7 Espectrometria de massas

Para verificar mudanças no peso molecular da sPLA2 foi realizado a espectrometria de massa utilizando o método de MALDI-TOF. De acordo com a Figura 21, pode se observar que sPLA2 e sPLA2:Q apresentaram peso de 14158,4 Da e 14460,6 Da respectivamente, uma diferença de 302,2 Da, indicando a presença de uma molécula de quercetina acoplada com a proteína.

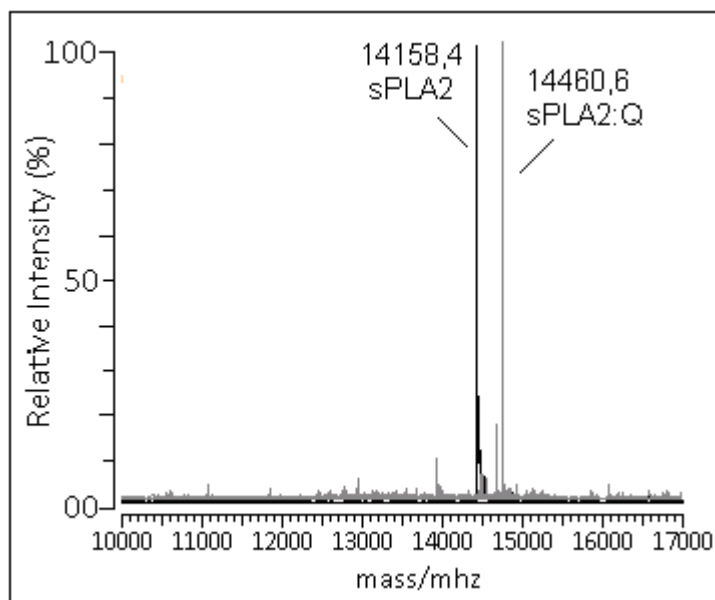


Figura 21: Espectrometria de massa por MALDI-TOF de sPLA2 e sPLA2:Q, mostrando uma diferença de massa correspondente à uma molécula de quercetina.

4.2.8 Edema de Pata

Para avaliar a ação da quercetina sobre a atividade inflamatória da sPLA2 verificou se a formação de edema em camundongos nas diferentes condições como descrito no item 3.6.1. Primeiramente, foi analisada a formação de edema com a sPLA2 nativa e com sPLA2 pré-incubada com quercetina. Assim foi injetada na pata direta de camundongos 25µL de cada proteína. Após adição do veneno, é possível observar um inchaço causado pela formação do edema (Figura 22)

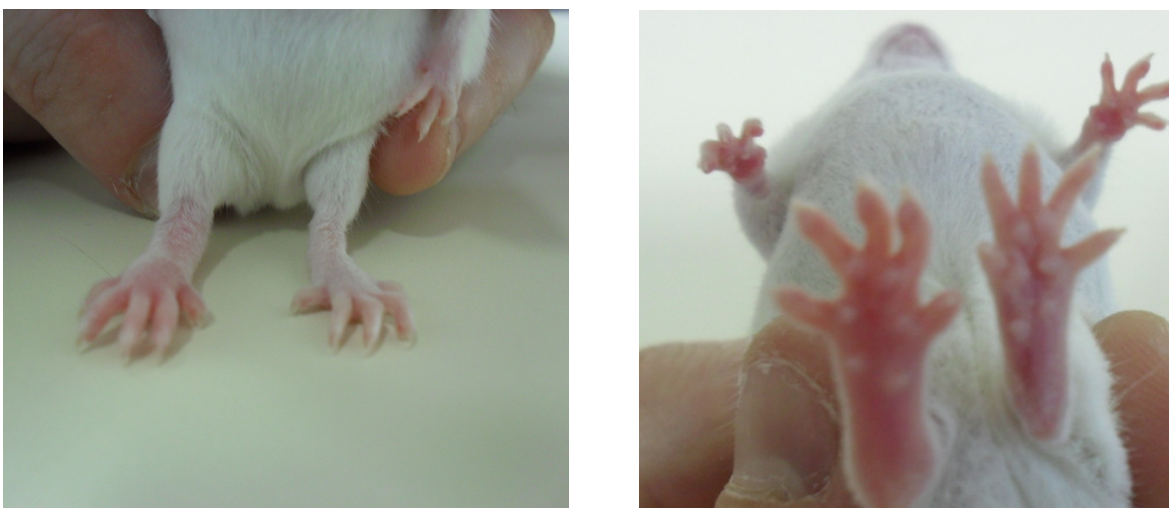


Figura 22: Formação de edema observada através do inchado da pata direita do camundongo.

A Figura 23 ilustra graficamente o edema causado pela sPLA2 nativa. Como pode ser observado o edema é caracterizado como um fenômeno agudo, com efeito máximo aos 30 minutos. Na presença da quercetina, pode-se observar que esta não aboliu a atividade edematogênica induzida pela sPLA2. Esse resultado está de acordo com os dados da literatura, já que mostram que a diminuição da atividade enzimática não influencia a formação de edema, indicando diferentes sítios ativos para ambas as atividades (Teixeira et al., 2003).

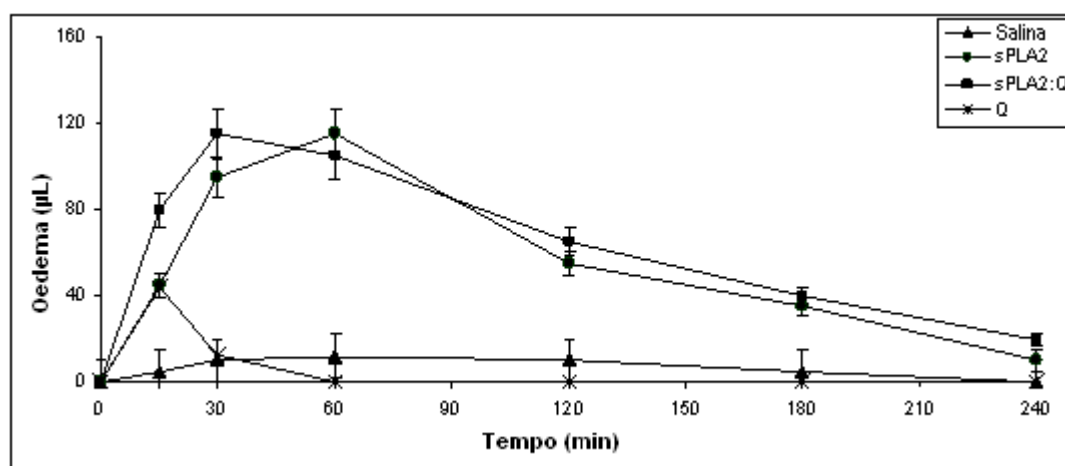


Figura 23: Edema de pata em camundongos induzido por sPLA2 – nativa e sPLA2:Q de *Crotalus durissus terrificus* (n=5).

Em seguida, foi analisado o efeito da quercetina sob a sPLA2 através de da co-incubação. Para isso, foram misturados 12,5 μL de sPLA2 ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) com 12,5 μL de quercetina nas concentrações de 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL e imediatamente aplicado na pata do camundongo. A sPLA2 nativa, usada como controle foi misturada com 12,5 μL de água para manter a mesma concentração.

A partir da Figura 24 pode-se observar que somente na concentração de 2,0 mg/mL a quercetina foi capaz de diminuir a formação de edema.

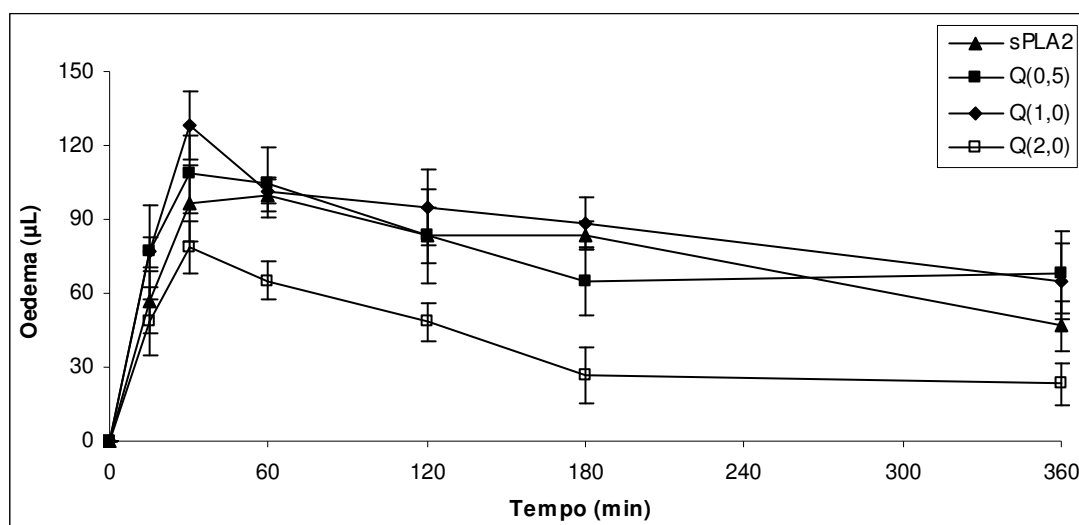


Figura 24: Edema de pata em camundongos induzido pela co-incubação de sPLA2 com três diferentes concentrações de quercetina (n=5).

4.2.9 Creatina quinase – miotoxidade

A creatina quinase é responsável por catalisar a transferência reversível do grupo N-fosforil da fosfocreatina para uma molécula de ADP regenerando ATP e formando creatina. Nos últimos anos, essa enzima vem sendo muito utilizada como indicador bioquímico na ocorrência de lesão muscular e sua presença no plasma sanguíneo sugerindo a existência de uma elevada agressão sobre as fibras musculares (Barbosa et al., 2003).

Com o objetivo de avaliar o efeito da quercetina sobre a ação miotóxica da sPLA2, três diferentes condições, como indicado no item 3.6.2 foram testadas. Primeiramente foi avaliada a ação da quercetina pela pré-incubação com a proteína. Desta forma, foi injetado no músculo gastrocnêmio de camundongos 25 μ L de sPLA nativa (1 μ g/ μ L) e de sPLA2 pré-incubada com quercetina (1 μ g/ μ L). Para avaliação do efeito foi usado o kit CK-NAC, o qual mede os níveis de creatina quinase presente no sangue.

Nesta primeira análise foi observada uma alta atividade miotóxica (Figura 25), correspondente a $821,39 \pm 107,8$ U/L de CK. Entretanto esse valor diminui em torno de 40% quando a proteína é pré-incubada com quercetina, apresentando um valor de $492,28 \pm 71,5$ U/L. Esse resultado indica que o sítio miotóxico da sPLA2 é distinto do sítio ativo referente à atividade edematogênica, mas que a atividade miotóxica pode estar diretamente relacionada com o sítio catalítico da enzima, uma vez que também foi observada uma diminuição de 40% na atividade catalítica após tratamento com quercetina.

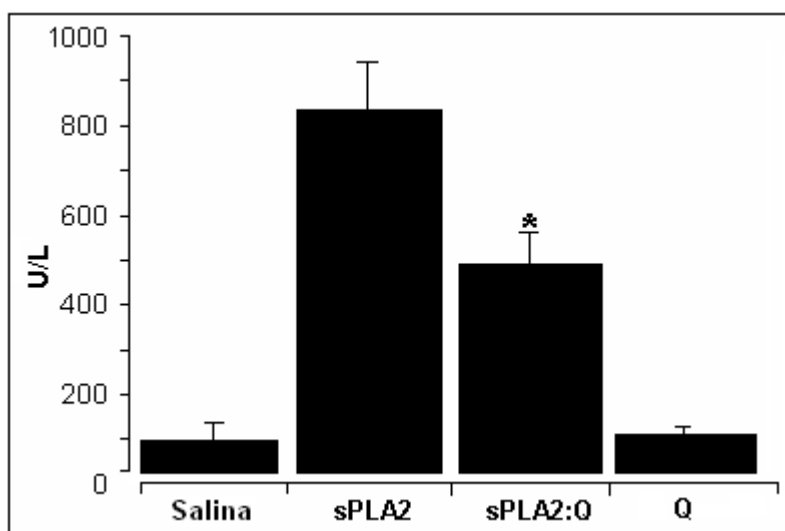


Figura 25: Ensaio de miotoxidade através dos níveis de creatina quinase. Diminuição de 40% após pré-incubação com quercetina. Barras de erro indicam EPM *P<0,05 comparado com atividade da sPLA2 (n=5).

A segunda análise foi realizada a partir da co-incubação da sPLA2 com as concentrações de 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL de quercetina. Imediatamente após a incubação as amostras foram injetadas no músculo dos camundongos.

Como mostrado na Figura 26, pode-se observar uma diminuição na atividade miotóxica quando a proteína é co-incubada com quercetina. De acordo com os resultados a sPLA2 apresentou $404,35 \pm 6,97$ U/L enquanto que a co-incubação com quercetina na concentração de 0,5 mg/mL [Q(0,5)] apresentou $247 \pm 11,85$ U/L, com Q(1,0) $317,23 \pm 4,68$ U/L e Q(2,0) $276,99 \pm 8,07$ U/L, uma diminuição de 38,68%, 21,60% e 31,50% respectivamente.

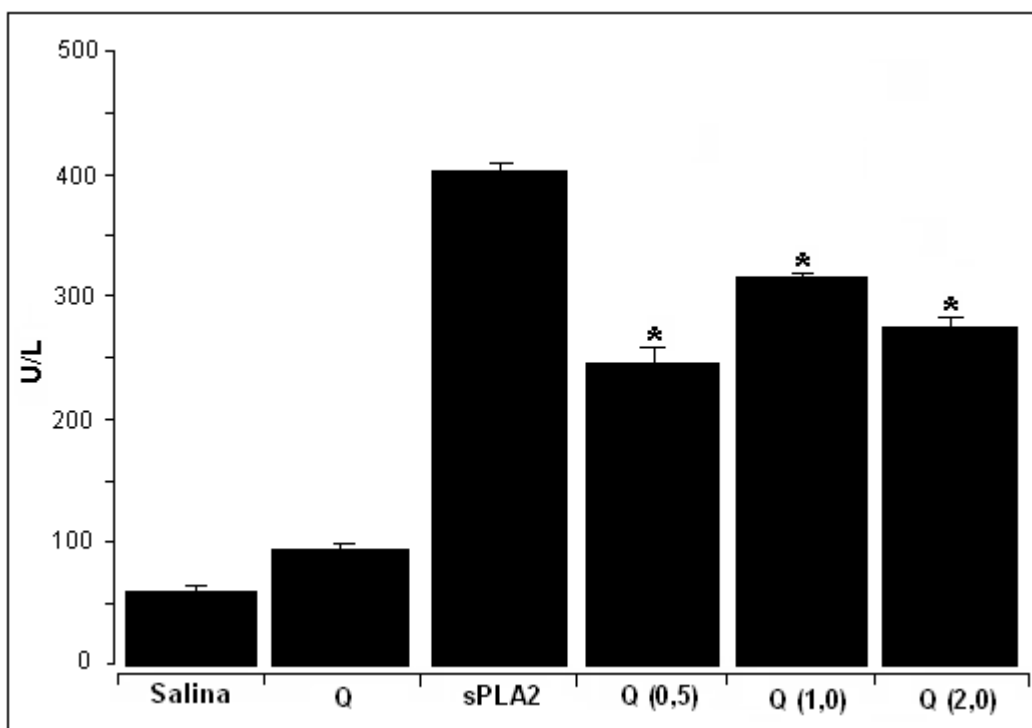


Figura 26: Miotoxidade após co-incubação da sPLA2 com quercetina nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. Barras de erro indicam EPM *P<0,05 comparado com atividade da sPLA2 (n=5)

4.2.10 Agregação Plaquetária

A agregação plaquetária consiste na formação de pontes intracelulares entre proteínas solúveis (principalmente fibrinogênio e fator VIII) e glicoproteínas insolúveis GP-Ib e GP-IIIa presente nas membranas plasmáticas. Esse processo é desencadeado quando a concentração de fibras expostas de colágeno é muito alta ou quando há presença de agonistas, tais como, ADP, ácido araquidônico, trombina, serotonina e epinefrina (Weiss e Lages, 1997).

A sPLA2 de veneno de serpente é capaz de inibir ou induzir a agregação plaquetária (Lu et al., 2002). Kini e Evans (1990) mostraram que PLA2 de serpentes é capaz de inibir a agregação induzida por trombina, sendo essa atividade independente da atividade catalítica. Entretanto, outras PLA2s mostraram se capazes de induzir agregação através da hidrólise de fosfolipídios de membrana e da liberação de ácido araquidônico e subsequentemente síntese de prostaglandina (Kini e Evans, 1990).

Para avaliar o efeito de quercetina sobre a habilidade de sPLA2 induzir ou inibir a agregação foi testada somente no processo de pré-incubação. A viabilidades das plaquetas foram testadas com ADP. A Figura 27(a) e 27(b) mostra a agregação plaquetária induzida pela sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus* nativa e sPLA2 tratada com quercetina, respectivamente, em três diferentes concentrações.

sPLA2 nativa mostrou uma habilidade moderada em causar agregação, já que sPLA2 de *Crotalus durissus cascavella* induziu em torno de 85% de agregação na concentração de 3µg/µL (Fonseca et al., 2006) e sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus* induziu 70% de agregação na concentração de 15µg/µL. O tratamento prévio com quercetina diminui para 32% o indução de agregação na mesma concentração, uma diminuição de 54%. Na

concentração de 10 μ g/ μ L a agregação plaquetária tende a diminuir, chegando a um valor próximo de zero.

Os resultados mostram que o tratamento prévio de sPLA2 com quercetina é importante para diminuição do efeito de agregação plaquetária, sugerindo uma possível relação dessa atividade com a atividade enzimática (Kini e Evans, 1990).

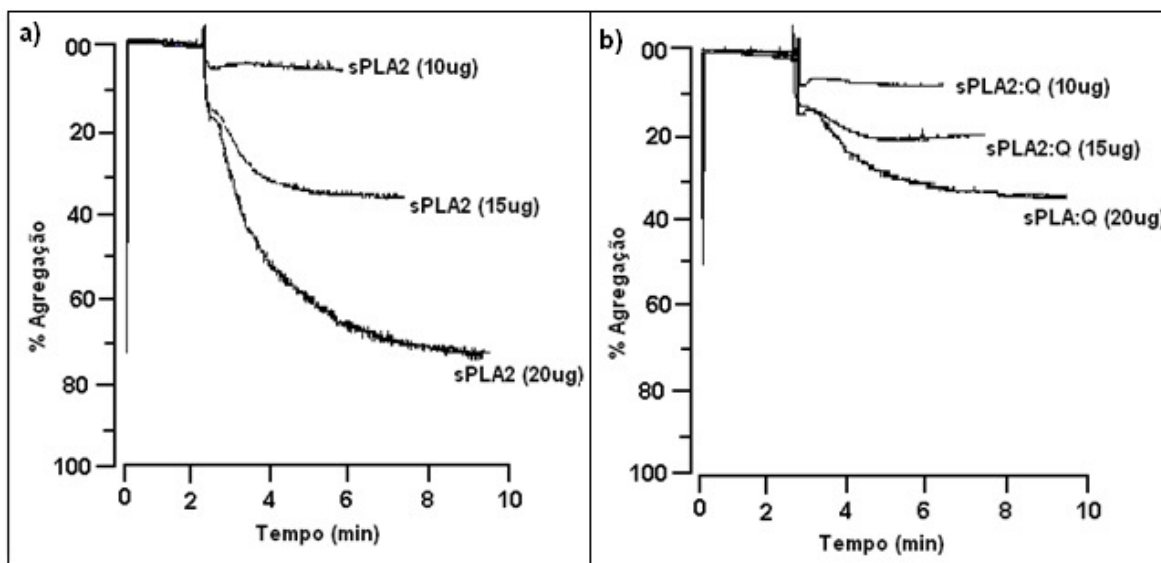


Figura 27: Ensaio de agregação plaquetária, gráfico dose dependente (a) sPLA2 nativa; (b) sPLA2 com quercetina. Concentração das sPLA2: 1 μ g/ μ L.

Os resultados mostram que a quercetina tem grande efeito sobre a atividade da sPLA2, alterando de forma significativa o perfil de agregação. Esse resultado indica que ao interagir com a proteína, a quercetina tende a modificar a estrutura proteica e então diminui a capacidade de agregação. Este resultado está de acordo com a literatura, pois segundo Formica e Regelson (1995), alguns flavonóides como a rutina e a quercetina são capazes de prevenir a agregação plaquetária através de interferências na biossíntese de eicosanóides.

4.2.11 Modelagem Molecular – Docking

O estudo de modelagem da sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus* acoplada com a quercetina foram realizado no Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas da Universidade Federal do Ceará.

A melhor solução de docking para a quercetina pode ser observada na Figura 28. A pontuação do GOLD para esse resultado foi de 43,94, mostrando uma boa afinidade da quercetina com a proteína.

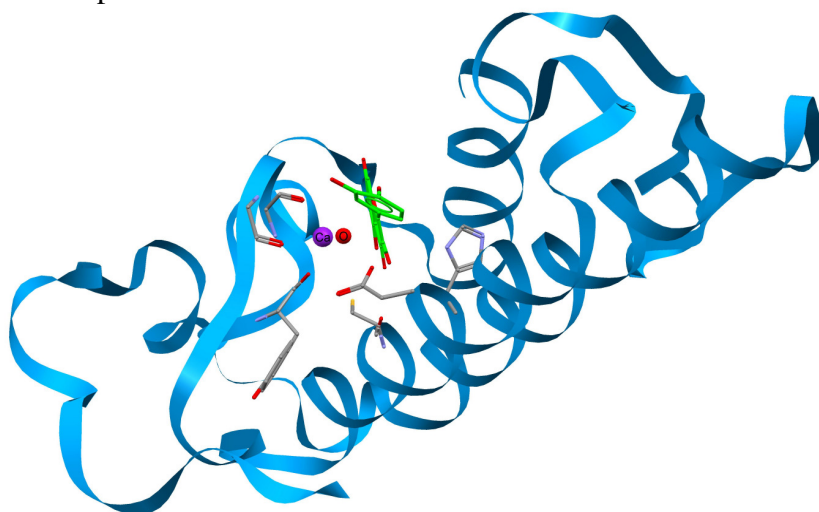


Figura 28: Solução de docking para quercetina (modelo de bastão) e resíduos importantes para interações com o alvo, além do íon Ca^{2+} e oxigênio da molécula de água.

As razões moleculares para a estabilidade da quercetina no sitio ativo da sPLA2 pode ser explicado principalmente pela presença de importantes interações intermoleculares (Figura 29), tais como: i) ligações de hidrogênio com os resíduos Cys45 30 e His48, com 2,69 e 3,00 Å respectivamente; ii) ligação de hidrogênio com molécula de água 188 com 3,16 Å ; iii) um contato polar com o íon Ca^{2+} com 3,19 Å; e iv) interações hidrofóbicas com o resíduo Phe5 podem favorecer a estabilidade do complexo quercetina-sPLA2.

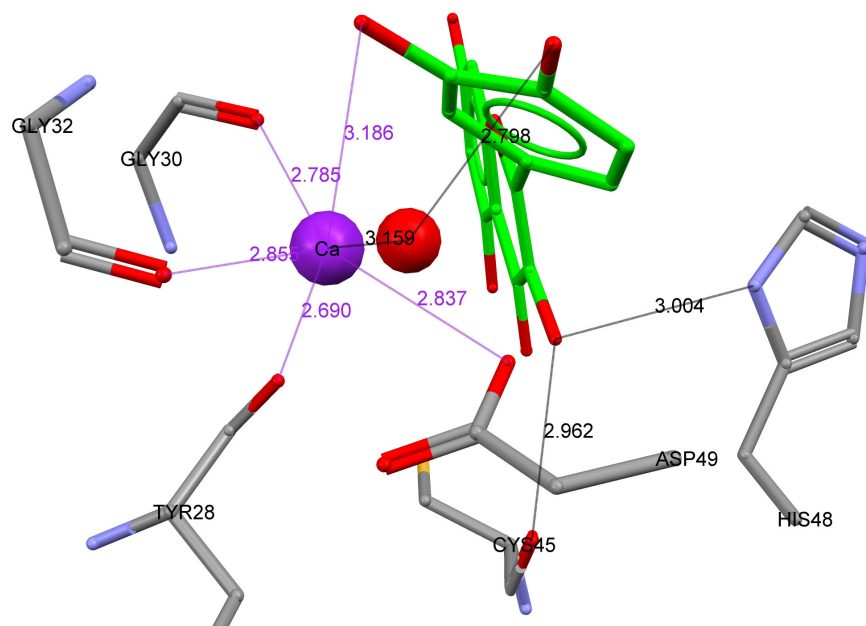


Figura 29: Esquema detalhado da região do sítio ativo da sPLA2 (distancias em Å). Átomos de hidrogênio foram omitidos e linhas ligadas ao íon Ca^{2+} representam a coordenação poliedral.

5a – DISCUSSÃO

Como primeira fase do trabalho, uma sPLA2 purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi submetida a tratamento químico com a quercetina (pré-incubação), um flavonóide conhecido pela sua atividade antiinflamatória (Lindahl e Tagesson, 1997). Após o tratamento, análise de dicroísmo circular mostrou uma modificação na estrutura secundária da proteína, resultado similar com o obtido por Iglesias e colaboradores (2005) com sPLA2 purificada do veneno de *Crotalus durissus cascavella* e tratada com o flavonóide morina. Entretanto, a quercetina não alterou a estabilidade térmica da sPLA2. A análise da fluorescência intrínseca do triptofano também foi realizada a fim de se observar mudanças em nível de estrutura terciária. Devido ao seu anel aromático, triptofano é geralmente encontrado parcialmente ou totalmente inserido na região hidrofóbica da proteína, assim ele pode tornar-se mais ou menos exposto dependendo das condições do meio (Royer, 2006). Após tratamento com quercetina, foi observado um aumento no espectro de fluorescência, possivelmente causado devido à fluorescência da quercetina, que apresenta um pico próximo da região do triptofano, portanto nada pode se concluir sobre mudanças na estrutura terciária da proteína após pré-incubação com o composto.

O tratamento com quercetina causou uma diminuição de 40% na atividade enzimática da sPLA2, resultado similar ao obtido após tratamento com brometo de p-bromofenacil (pBPB), um inibidor de PLA2. De acordo com os resultados de docking, quercetina se liga no resíduo His48, levando a uma diminuição da atividade enzimática. Como demonstrado por alguns autores, esse resíduo é fundamental para a atividade catalítica, uma vez que está envolvido na primeira etapa da reação (Verheij et al., 1980; Scott e Sigler, 1994). Desta

forma, os resultados sugerem que a ligação da quercetina interfere na ligação entre a enzima e o substrato.

As sPLA2 presentes em venenos de serpentes exercem uma grande variedade de efeitos farmacológicos, dentre eles, uma importante atividade edematogênica (Gutiérrez e Lomonte 2003). O edema induzido pelos venenos se caracteriza por ser de aparecimento imediato, podendo alcançar seu pico em intervalo de 15-30 minutos (Cardoso et al., 2001). Estas substâncias podem induzir edema através da liberação do ácido araquidônico em consequência da degradação enzimática da membrana fosfolipídica, aumentando a biossíntese de eicosanóides. Segundo Teixeira e colaboradores (2003), três formas de PLA2 estão envolvidas com a liberação de ácido araquidônico: tipo IV; PLA2 citossólica e PLA2 secretórias do tipo II e V. Uma vez liberado o ácido araquidônico é convertido em intermediários instáveis (PGG_2 e PGH_2) pelas ciclooxygenases 1 e 2 (COX-1; COX-2) e então PGH_2 é convertido nas prostaciclina ativa PGD_2 ; PGE_2 ; $\text{PGF}_{2\alpha}$; PGI_2 ou em tromboxanos A2 (TXA_2) através da ação de síntases específicas. Prostaglandinas tem um importante papel na inflamação e na hiperalgesia. Embora elas pareçam não estar relacionada diretamente com efeitos de permeabilidade vascular, PGE_2 e PGI_2 aumentam a formação de edema e infiltração de leucócitos promovendo o fluxo sanguíneo na região inflamada (Teixeira et al., 2003).

Os lipídios hidroperóxidos resultantes do metabolismo do ácido araquidônico pelas enzimas lipoxigenases (5-, 12-, e 15-, lipoxigenases) também exercem função relevante como mediadores de inflamação. O peptidoleucotrienos (LTC_4 ; LTD_4 e LTE_4) apresentam grande efeitos na permeabilidade vascular (Teixeira et al., 2003).

Vários estudos têm investigado os efeitos anti-inflamatórios dos flavonóides bem como seus efeitos sobre os sítios farmacológicos e catalíticos das sPLA2 (Lindahl e Tagesson, 1997; Kim et al., 2001; Iglesias et al., 2005; Lättig et al., 2007; Toyama et al., 2009). Segundo esses modelos, moléculas de flavonóides podem interagir com sítio enzimático da sPLA2 e alterar a atividade catalítica e algumas ações farmacológicas.

Apesar de induzida a atividade enzimática, observa-se que não houve mudanças significativas no edema induzido pela sPLA2 nativa ou sPLA2:Q. Resultado semelhante foi observado por Toyama e colaboradores (2009) após tratamento da sPLA2 da *Crotalus durissus collilineatus* com 7-hidroxycumarina, sugerindo a existência de um diferente sítio possivelmente modulatório, não relacionado com a atividade catalítica e responsável por ações farmacológicas.

A co-incubação da sPLA2 com quercetina mostrou seguir uma curva dose-resposta, em que concentrações mais baixas (0,5 e 1,0 mg/mL) não mostraram efeito sobre a formação de edema. Porém, inibição pode ser observada na concentração de 2,0 mg/mL. Esse último resultado indica o efeito antiinflamatório da quercetina sobre a sPLA2, como observado por Lindahl e Tagesson (1997).

A miotoxidade induzida pelo evenenamento por serpentes tem como principal agente indutor a sPLA2. O mecanismo para esse efeito não é único e envolve inúmeros fatores, tais como dependência ou não de cálcio e interação das moléculas de sPLA2 com células musculares (Gutierrez e Ownby 2003) Após pré-incubação com quercetina e co-incubação da mesma, a sPLA2 apresentou uma diminuição de 40% e 38,68% [Q(0,5 mg/mL)] respectivamente na atividade miotóxica, sugerindo que esse composto pode alterar o

domínio catalítico da sPLA2 levando a alterações no sítio próximo a região de loop do Ca^{2+} como proposto por Valentin e Lambeau (2000).

Resultado semelhante foi observado para agregação plaquetária, uma diminuição de 55% dessa atividade após tratamento quercetina. Esse resultado indica que a atividade de agregação é fortemente influenciada pela quercetina, além de sugerir uma relação com a atividade catalítica. Os resultados sugerem que tanto atividade miotóxica como de agregação plaquetária são decorrentes da ação catalítica da sPLA2, que foi inibida pela quercetina.

O docking molecular tem sido muito utilizado nas últimas décadas devido sua importância para elucidar, através de técnicas computacionais o melhor tipo de interação entre uma proteína e um ligante (Halperin et al., 2002). Nesse estudo, o docking molecular mostrou ser uma importante ferramenta para entendimento do tipo de interação entre a quercetina e a sPLA2. O resultado de docking demonstrou que uma molécula de quercetina, como observado na espectrometria de massa (MALDI-TOF), interage com o núcleo catalítico da sPLA2.

Outro resultado apresentado pelo docking foi à interação molecular do Ca^{2+} com a quercetina. O cálcio tem um papel fundamental no mecanismo catalítico da enzima. Nas PLA2 cataliticamente ativas o cálcio desempenha uma função dupla que é a de fixar o grupo fosfato e estabilizar a carga negativa do ácido carboxílico do fosfolipídio de membrana (Ward et al., 1998; Lee et al., 2001). Desta forma, a interação entre a sPLA2 e a quercetina leva a uma indisponibilidade molecular do sítio do cálcio da enzima, possivelmente causada por um impedimento estérico da quercetina. Esse fato explica a diminuição observada na atividade enzimática.

A importância do estudo docking molecular para elucidar as interações entre a proteína e o ligante nos permitiu melhor entender as razões moleculares que levaram a modificações nas atividades catalíticas e farmacológicas da sPLA2, sendo esse estudo uma boa ferramenta para avaliar a interação de polifenólicos com a proteína em trabalhos futuros.

6a – CONCLUSÃO

Os resultados apresentados, embora parciais, permite as seguintes conclusões:

1) O processo de pré-incubação da sPLA2 com quercetina foi executado com êxito, já que modificações no perfil cromatográfico e em dados de espectrometria de massas foram observados.

2) O processo de pré-incubação com quercetina levou a modificações em nível de estrutura secundária sendo observado através de modificações no espectro de dicroísmo circular.

3) O processo de co-incubação apresenta melhor inibição nas atividades farmacológicas (edema e miotoxidade) do que o processo de pré-incubação

4) Para inibição da atividade enzimática, a pré-incubação é essencial para uma melhor performance do composto.

5) sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus* apresenta provavelmente dois sítios farmacológicos distintos: um responsável pelos efeitos de agregação plaquetária e miotoxidade; e outro responsável pelos efeito edematogênico. Acredita-se que o primeiro está localizado próximo ao loop de ligação do cálcio e conseqüentemente próximo ao sítio catalítico onde ocorre a ligação da quercetina com a proteína, causando então a diminuição das atividades dependente desse sítio. O segundo está localizado próximo a região C-terminal, distante da região onde ocorre a ligação com a quercetina e conseqüentemente não é afetado pela ligação com a quercetina.

6) Através de docking molecular propõem-se que a quercetina se liga próximo à região catalítica sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus* causando um impedimento estérico o que dificulta a aproximação e a ligação do cálcio com a proteína.

7) Estudos de docking são uma boa alternativa para o esclarecimento sobre os possíveis sítios de ligação da enzima com um ligante específico.

8) Uso de compostos polifenólicos com estruturas similares as desses estudados podem agir como possíveis inibidores de sPLA2.

4.3 Hecogenina - Sapogenina (CR01)

4.3.1 Tratamento– pré incubação.

Neste segundo trabalho foi testada a ação de uma molécula orgânica denominada hecogenina (CR01). O método utilizado para o tratamento de sPLA2 com hecogenina foi o mesmo que para a quercetina. Após incubação, sPLA2 tratada (sPLA2:CR01) foi purificada em coluna de fase reversa. A Figura 30 mostra o perfil cromatográfico antes e após a incubação com CR01.

Como ilustrado abaixo, não é possível observar uma mudança no tempo de retenção após tratamento com hecogenina, somente uma alteração na base dos pico, indicando possíveis modificações da proteína causada pela hecogenina, levando a diferentes interações da amostra com a coluna.

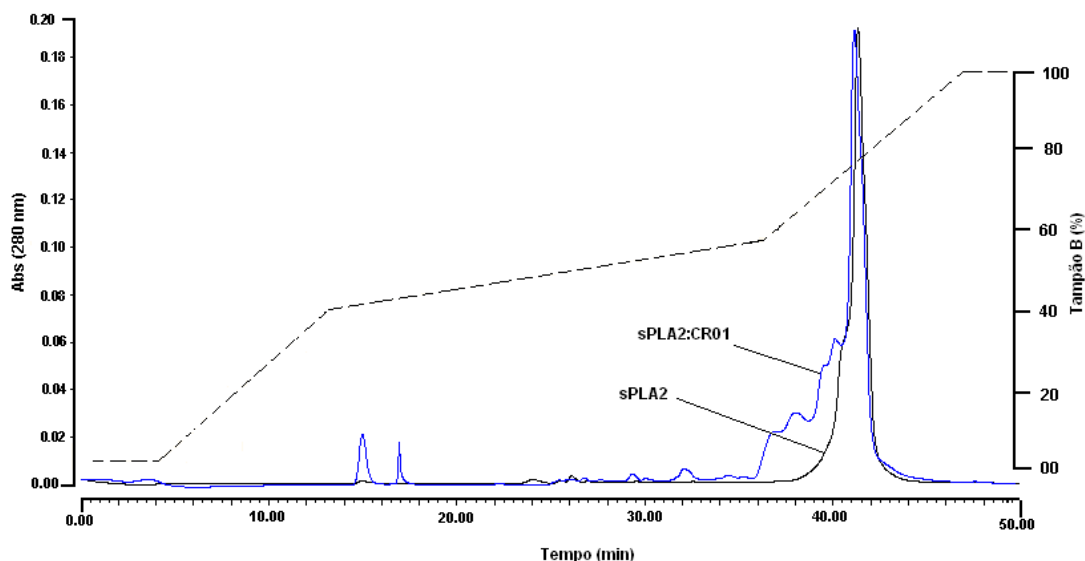


Figura 30: Perfil cromatográfico da sPLA2 antes e após tratamento química com hecogenina (CR01).

4.3.2 Atividade Enzimática das sPLA2

O efeito da sapogenina CR01 sobre a atividade de PLA2 do veneno de *Crotalus durissus terrificus* também foi analisado utilizando o substrato cromogênico ácido 4-nitro-

3-(octanoyloxy) benzóico - NOBA. Como pode se analisar na Figura 31(a) houve uma diminuição considerável da atividade enzimática após tratamento com CR01, possivelmente causada por interações ou ligação entre a proteína e o composto.

Um gráfico de barras foi plotado (Figura 31b) após 20 min. de reação para analisar em números a diminuição causada pela hecogenina. A velocidade de reação para sPLA2 nativa foi de $1,4266 \pm 0,158$ mmoles/min, enquanto que para sPLA2 tratada com hecogenina foi de $0,6421 \pm 0,201$ mmoles/min, mostrando uma diminuição de 55 % da atividade enzimática

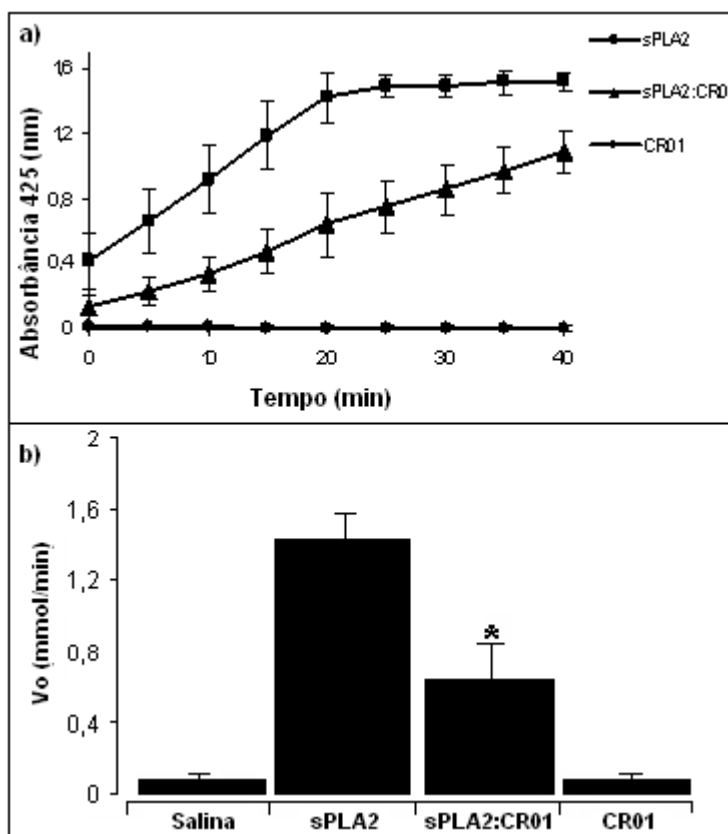


Figura 31: Ensaio enzimático sPLA2 e sPLA2:CR01 (a) atividade enzimática foi analisada usando 4N3OBA como substrato e monitorado com comprimento de onda de 425nm a 37°C. (b) atividade enzimática após 20 minutos de reação. Barras de erro indicam EPM *P<0,05 comparado com atividade da sPLA2 (n=5).

Além da avaliação da atividade enzimática da sPLA2 pré-incubada com hecogenina, foi também analisado o efeito desse composto com a proteína no processo de co-incubação, para isso, diferentes concentrações de hecogenina foram co-incubadas com a proteína e com o substrato de acordo com a Tabela 1. Em todo procedimento a concentração proteica foi de 3,96 μM .

Tabela 1: Condições utilizadas para co-incubação (CR01: 430,65g.mol⁻¹).

<i>Tampão</i> <i>V(μL)</i>	<i>Substrato</i> <i>V(μL)</i>	<i>sPLA2</i> <i>v(μL)</i>	<i>Água</i> <i>V(μL)</i>	<i>CR01</i> <i>(1mg/mL)</i> <i>V(μL)</i>	<i>CR01</i> <i>(μM)</i>
150	40	20	90	-----	-----
150	40	20	85	5	38,7
150	40	20	75	15	116,1
150	40	20	70	20	154,8
150	40	20	60	30	232,2
150	40	20	-----	90	696,6

O resultado da Figura 32(a) mostra que todas as enzimas co-incubadas permaneceram linear para a formação de produtos, atingindo uma velocidade máxima no tempo de 45 minutos. Entretanto, somente na concentração de 154,8 μM (referente a 20 μL de CR01) é que houve diminuição significativa de formação do produto.

Na Figura 32(b) pode se observar que a hecogenina mostrou efeito dose resposta, já que em concentrações menores e maiores do que 154,8 μM um aumento na atividade enzimática pode ser observado.

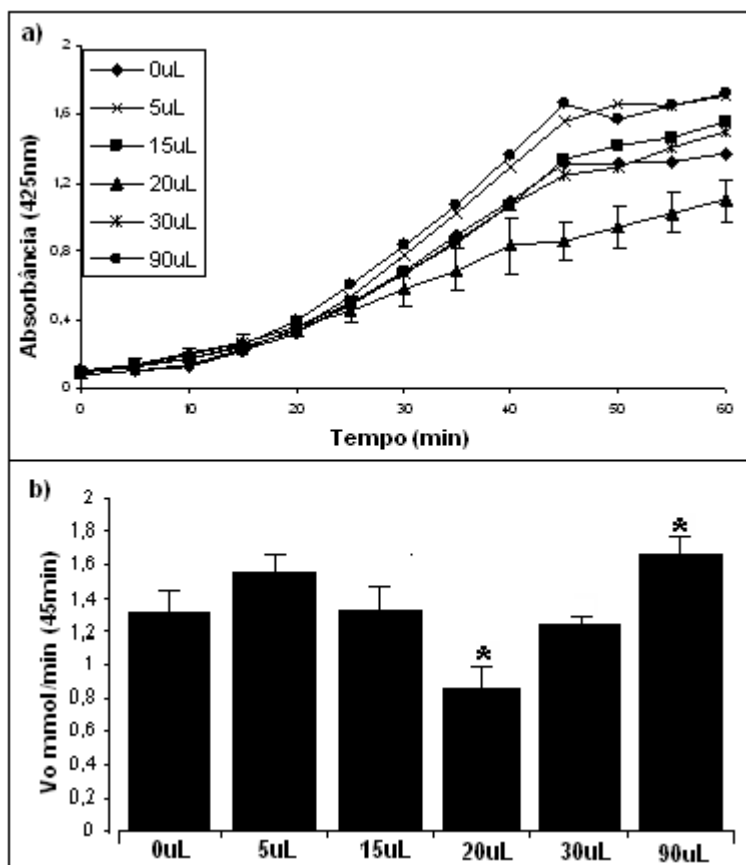


Figura 32: (a) Avaliação do efeito de CR01 sob a ação enzimática da sPLA2 em diferentes concentrações durante um intervalo de tempo. (b) Comparação do efeito de CR01 após 45 min. de reação. Barras de erro indicam EPM *P<0,05 comparado com atividade da sPLA2 (n=5).

4.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil da massa molecular em PAGE-SDS da sPLA2 antes, após e na forma reduzida está mostrado na Figura 33. Como observado, as frações apresentam somente uma banda e massa molecular de ~14 kDa, tanto em condições não reduzidas como em condições reduzidas com DTT, demonstrando que hecogenina não alterou de forma significativa o peso molecular da sPLA2.

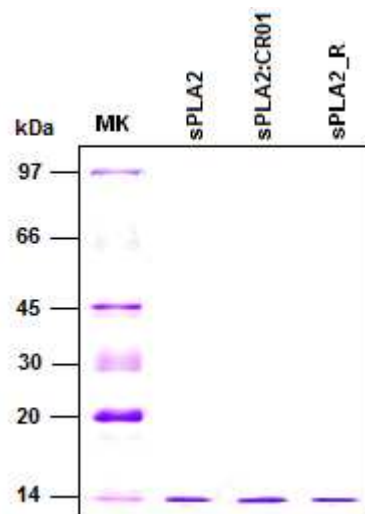


Figura 33: SDS Page sPLA2 antes e após tratamento com CR01. R indica condições reduzidas.

4.3.4 Dicroísmo Circular (CD)

As medidas de dicroísmo circular foram realizadas com o objetivo de verificar possíveis modificações na estrutura secundária da sPLA2 causada pelo tratamento com a hecogenina. O perfil espectroscópico de CD da sPLA2 nativa e sPLA2:CR01 está representado na Figura 34.

O espectro, como observado para a quercetina, apresenta de bandas características de α -hélice na região próximas a 208 e 220 nm. Entretanto, não foram observadas mudanças no espectro após tratamento com hecogenina, sugerindo que este composto não causa modificações na estrutura secundária da sPLA2.

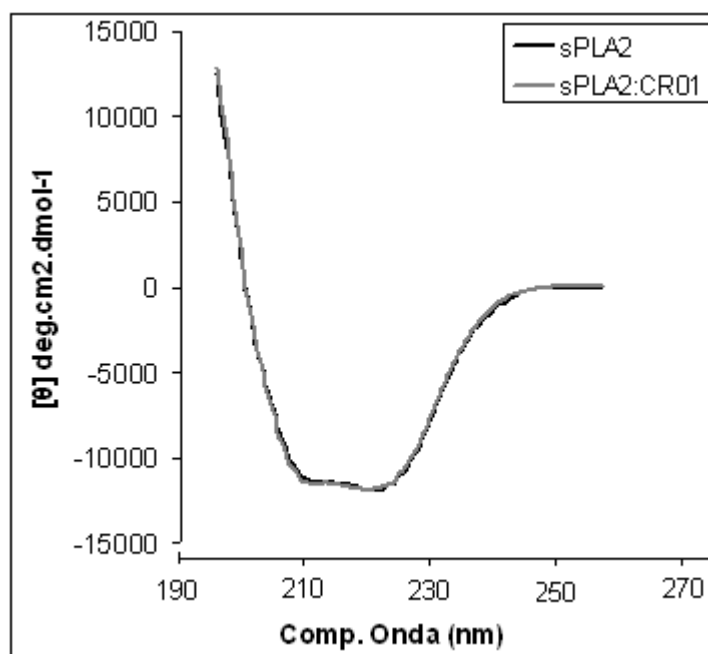


Figura 34: Perfil espectroscópico de dicroísmo circular de sPLA2 e sPLA2:CR01 em meio aquoso. A concentração de ambas as proteínas foi de 15 μ M.

4.3.5 Estudos de Estabilidade Térmica

Para avaliar modificações na estabilidade da sPLA2 após tratamento químico, foi escolhido o método de aumento de temperatura. Desta forma, sPLA2 e sPLA2:CR01 foram aquecidas de 20°C a 90°C com comprimento de onda de 222 nm e em seguida foram resfriadas as condições iniciais. A Figura 35 mostra o espectro obtido durante o aquecimento de sPLA2 e sPLA:CR01 durante o aquecimento.

A Figura 35 mostra que não houve modificações estruturais durante o aquecimento de sPLA2 após tratamento químico com a hecogenina. O fato de hecogenina não alterar a estabilidade da sPLA2 indica que interações ou ligações desse composto com a proteína não interfere nas ligações de dissulfeto, permitindo que sPLA2 mantenha sua estrutura.

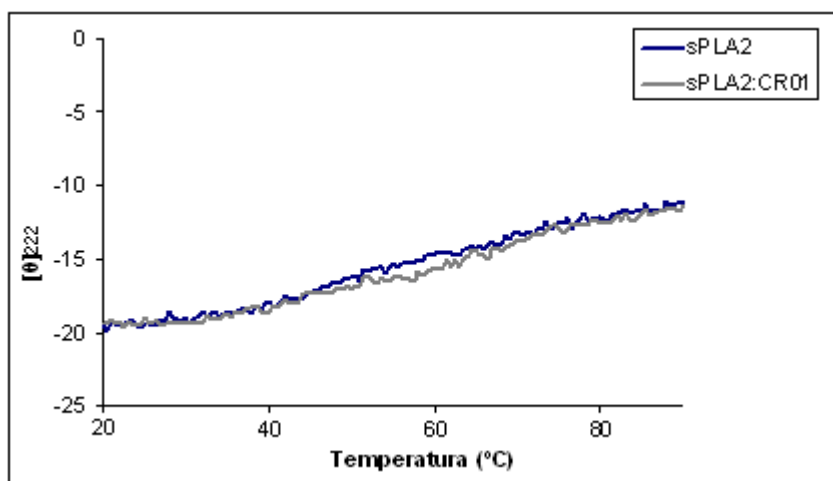


Figura 35: Espectros de estabilidade em função de variações na temperatura de sPLA2 e sPLA2:CR01

4.3.6 Fluorescência Intrínseca

Com o objetivo de avaliar mudanças na estrutura proteica de sPLA2 causada pela tratamento químico com hecogenina, foi realizado ensaio de fluorescência intrínseca. A Figura 36 mostra o espectro de fluorescência de sPLA2 e sPLA2:CR01.

Comparando ambos os espectros, pode-se observar uma menor intensidade na fluorescência do sPLA2 pré-tratada com hecogenina. Esse resultado indica que após o tratamento químico houve uma leve diminuição no contato do resíduo de triptofano da proteína com grupos polares fazendo com que o triptofano fique mais escondido na estrutura da proteína diminuindo assim a intensidade da fluorescência. Esse resultado sugere mudanças conformacionais da sPLA2 em nível de estrutura terciária pela hecogenina.

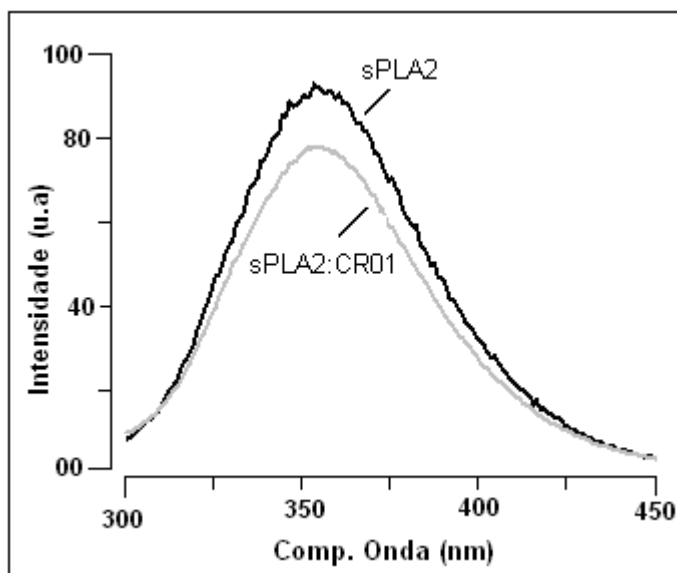


Figura 36: Espectro de emissão de fluorescência de sPLA2 e sPLA2:CR01, á 52 μ M em água. Excitação á 280 nm e emissão a 350 nm.

4.3.7 Edema de Pata

Para avaliar a ação da hecogenina sobre a atividade inflamatória da sPLA2 verificou se a formação de edema em camundongos nas diferentes condições como descrito no item 3.6.1. Primeiramente foi comparado a formação de edema com a sPLA2 nativa e com sPLA2 pré-incubada com CR01. Desta forma foi injetada na pata direita dos camundongos 25 μ L de cada proteína

Como observado na figura 37, o edema causado pela sPLA2 nativa possui efeito máximo aos 30 minutos. Na presença de CR01, pode-se observar que este composto não aboliu a atividade edematogênica induzida pela sPLA2, pelo contrário, o efeito foi potencializado após 120 minutos. Nos tempos de 240 e 360 minutos CR potencializou 1,5x o efeito enquanto que no tempo de 420 minutos essa potencialização foi de 2,0x. Esse resultado indica que de forma ainda não conhecida, CR01 interage na proteína deixando a região responsável pela inflamação mais exposta.

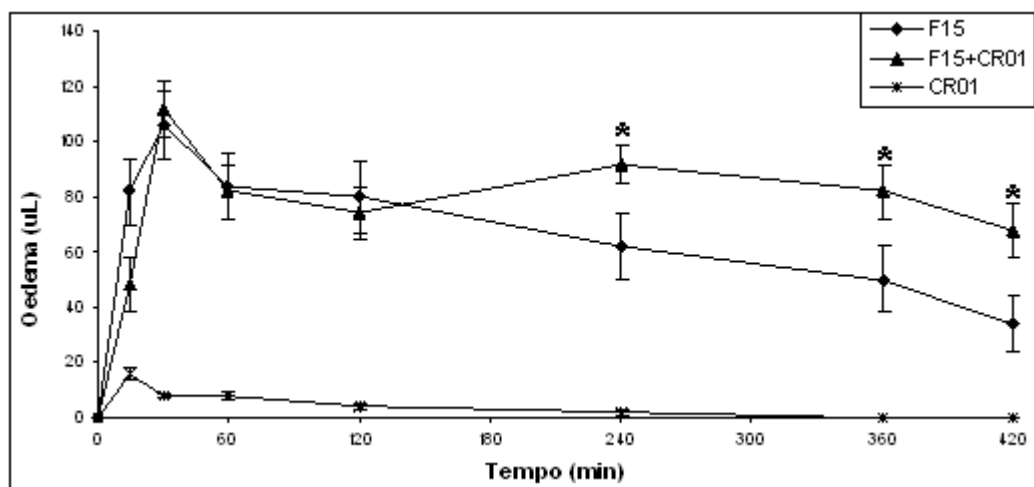


Figura 37: Formação do edema de pata após injeção de sPLA2 e sPLA2 pré incubada com CR01. Barras de erro indicam EPM *P<0,05 comparado com atividade da sPLA2 (n=5).

Posteriormente foi analisado o efeito da hecogenina sobre a sPLA2 através da co-incubação. Para isso, foi misturado 12,5 µL de sPLA2 (1µg/µL) com 12,5 µL de CR01 nas concentrações de 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL e imediatamente aplicado na pata do camundongo. A sPLA2 nativa, usada como controle foi misturada com 12,5 µL de água para manter a mesma concentração.

Pode-se observar na Figura 38 que somente na concentração de 2,0 mg/mL após 60 min a hecogenina foi capaz de diminuir a formação de edema.

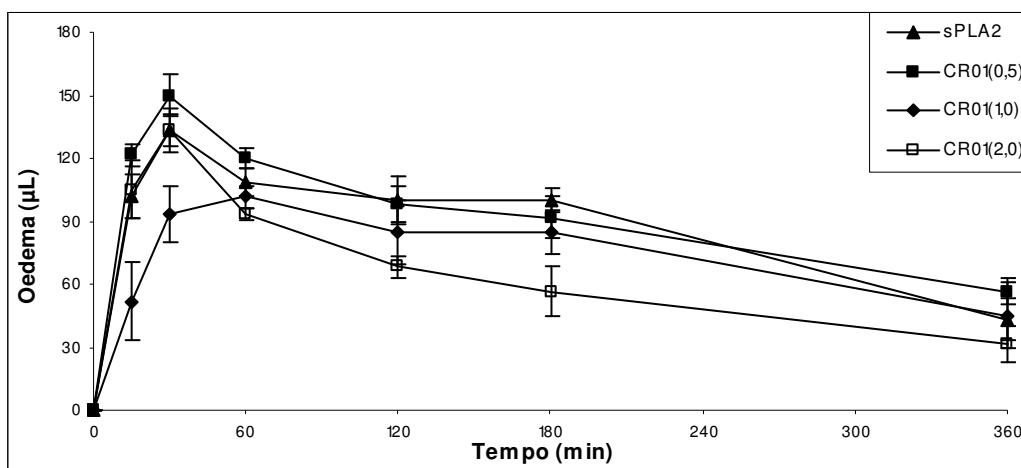


Figura 38: Efeito da hecogenina sobre atividade edematogênica da sPLA2 no processo de co-incubação sPLA2 e CR01(n=5).

De acordo com os resultados obtidos, pode se observar que o efeito da CR01 na inibição da atividade edematogênica é mais significativo no processo de co-incubação, sendo o tratamento químico um processo não necessário para inibição da proteína pela hecogenina.

4.3.8 Creatina Quinase – miotoxicidade

Com o objetivo de avaliar o efeito da hecogenina sobre a ação miotóxica da sPLA2, duas diferentes condições, como indicado no item 3.6.2 foram testadas. Primeiramente foi avaliada a ação da hecogenina pela pré-incubação com a proteína. Desta forma, foi injetado no músculo gastrocnêmio de camundongos 25 μ L de sPLA nativa (1 μ g/ μ L) e de sPLA2 pré-incubada com hecogenina (1 μ g/ μ L). Para avaliação do efeito foi usado o kit CK-NAC, o qual mede os níveis de creatina quinase presente no sangue.

Nesta primeira análise, diferentemente da quercetina, foi observada uma elevação da atividade miotóxica da sPLA2 após tratamento prévio com CR01 (Figura 39). Enquanto sPLA2 nativa apresentou níveis de CK de $651,44 \pm 37,9$ U/L, sPLA2:CR01 apresentou de $903,67 \pm 49,5$ U/L, um aumento de 27,8%. Esse resultado sugere que a hecogenina interage de uma maneira diferente com sPLA2, sendo capaz de inibir a atividade enzimática mas não a miotóxica. Entretanto, esses dados são preliminares, sendo necessário estudos de docking para melhor entender a ligação/interação da hecogenina com sPLA2.

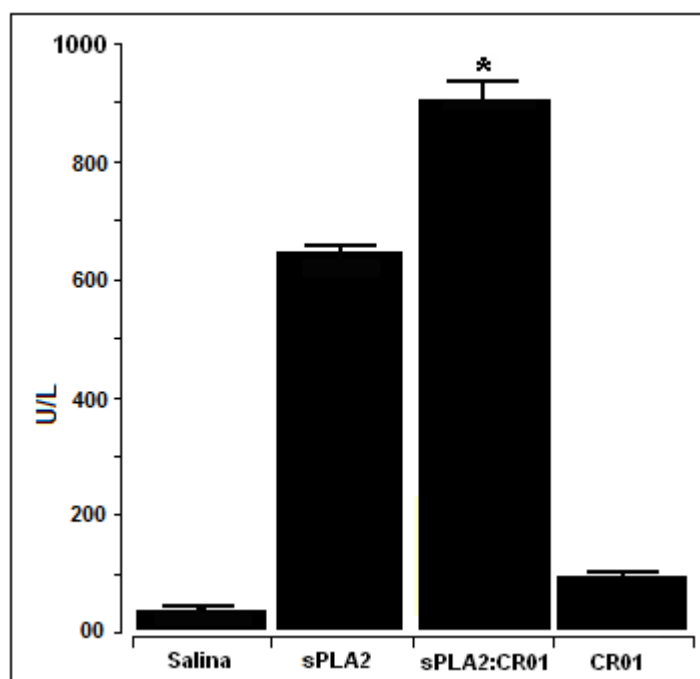


Figura 39: Ensaio de miotoxidade através dos níveis de creatina quinase. Aumento de 27,8% após pré-incubação com CR01. Barras de erro indicam EPM *P<0,05 comparado com atividade da sPLA2 (n=5).

A segunda análise foi realizada a partir da co-incubação da sPLA2 com as concentrações de 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL de CR01. Imediatamente após a incubação as amostras foram injetadas no músculo dos camundongos.

Na Figura 40, pode se observar que o efeito da CR01 na condição co-incubada sobre a sPLA2 foi menor que da quercetina. De acordo com os resultados a sPLA2 apresentou $166,62 \pm 16,06$ U/L enquanto que a co-incubação com CR01 na concentração de 0,5 mg/mL [CR01(0,5)] apresentou $139,64 \pm 12,96$ U/L, com CR01(1,0) $140,84 \pm 10,85$ U/L e CR01(2,0) $163,56 \pm 11,54$ U/L, uma ação praticamente nula levando em consideração os desvios padrão. Entretanto, a co-incubação se mostrou mais eficaz do que a pré-incubação, já que desta forma os níveis de CK se mantiveram constante.

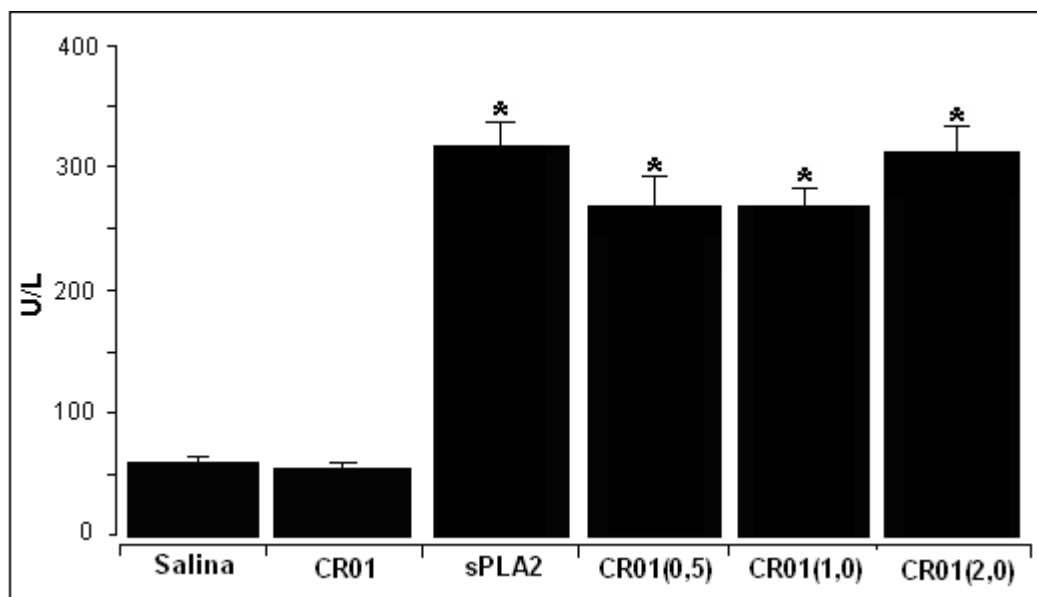


Figura 40: Miotoxidade após co-incubação da sPLA2 com hecogenina (CR01) nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. EPM * $P < 0,05$ comparado com salina (n=5).

5b – DISCUSSÃO

A planta Agave é considerada a única planta fornecedora de fibras com propriedades terapêuticas. A espécie *Agave sisalana* é popularmente conhecida no Brasil como sisal e é destinada à indústria de cordoaria (cordas e tapetes). Além de sua utilização no artesanato, essa planta é uma rica fonte de saponinas esteroidais: hecogenina e tigogenina (Nunes Moreira et al., 1999).

Do ponto de vista farmacológico, o extrato obtido da *A. sisalana* estimula a contração da musculatura intestinal e uterina, sendo capaz de causar abortos em animais. Outra atividade descrita foi a capacidade desse extrato em inibir o crescimento bacteriano (Debnath et al., 2010).

De acordo com a literatura, as saponinas esteroidais possuem propriedade antiinflamatória, porém, essa atividade eventualmente é acompanhada de um efeito colateral hemolítico (Lacaille-Dubois et al., 1996; Odak et al., 2000).

Devido à sua atividade farmacológica, a hecogenina (CR01) foi escolhida para avaliar seu efeito sobre as atividades de sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus*, já que até o momento nada se tem na literatura referente a esse composto e veneno de serpentes. Os resultados apresentados, indicam que a hecogenina não afeta a estrutura secundária da sPLA2, já que não houve modificações no espectro de dicroísmo circular. Existem nas sPLA2 em torno de 7-8 ligações dissulfeto, responsáveis pela estabilidade da molécula. A interação da hecogenina com a proteína, não causou modificações na estabilidade da proteína frente a altas temperaturas indicando que essas interações não interferem nas ligações dissulfeto da proteína. Entretanto, foi observada uma diminuição da fluorescência

intrínseca da proteína, possivelmente causada devido a uma menor exposição das moléculas de triptofano, sugerindo modificações em nível de estrutura terciária.

O tratamento com hecogenina causou uma diminuição de 55% da atividade enzimática quando pré-incubada e 34,22% quando co-incubada, mostrando que a pré-incubação é um passo importante para uma melhor inibição. Além disso, os resultados de co-incubação mostraram que em concentrações menores ou maiores que 154,8 μ M (20 μ L) a hecogenina aumenta a atividade catalítica, sugerindo que esse composto dependendo da dose, pode induzir danos.

A diminuição da atividade catalítica sugere que a hecogenina pode interagir de duas maneiras na sPLA2, no mesmo sítio que a quercetina ou próximo dessa região, que levaria a uma diminuição da ligação do cálcio com a proteína e conseqüentemente perda da atividade ou que ao interagir com a sPLA2, a hecogenina causa mudanças estruturais afetando o sítio de ligação do cálcio.

Os teste de atividade antiinflamatória mostraram que a sPLA2:CR01 não afetou o início do processo. Yamazaki e colaboradores (2005) demonstraram que tanto a ação de sPLA2 Lys49 quanto a de Asp49 induz atividade sobre as células neuromusculares, mediante interação da região C-terminal com determinados receptores celulares. A ação miotóxica também depende da interação da região C-terminal e do resíduo de lisina na posição 49 com determinados receptores (Gutierrez e Owby, 2003). Isso pode ser comprovado com o uso da heparina, um polissacarídeo sulfatado, que interage fortemente com os resíduos básicos da sPLA2 da região C-terminal. Outros estudos realizados com sPLA2 de abelhas mostram que estas enzimas induzem atividades farmacológicas sobre

macrófagos, mediante reconhecimento dos receptores de manose (Mukhopadhyady e Stahl, 1995).

Lambeau e Lazdunsk (1999) sugerem que uma das regiões moleculares envolvidas na interação molecular de sPLA2 com receptores tipo N ou M envolve regiões próximas ao sítio de cálcio, contudo esses autores não descartam outras regiões moleculares envolvidas na interação de sPLA2 com receptores. Portanto, a atividade farmacológica de uma grande diversidade de sPLA2 não depende necessariamente da atividade enzimática.

Os resultados de edema para a sPLA2 nativa e sPLA2:CR01 não apresentaram diferenças no início da atividade inflamatória, sugerindo que a hecogenina não afeta interação entre sPLA2 e receptores. Por outro lado, após 120 minutos o edema induzido pela sPLA2:CR01 tem um aumento, possivelmente causado por uma maior estabilidade entre sPLA2 e receptores. Já o processo de co-incubação mostrou um efeito de dose resposta, em que pode ser observada uma maior inibição da atividade edematogênica de acordo com o aumento da concentração de hecogenina, mostrando seu efeito anti-inflamatório como observado por Lacaille-Dubois et al., (1996).

O efeito da hecogenina sobre a atividade miotóxica da sPLA2 também foi avaliado. Entretanto, resultado surpreendente foi observado após pré-tratamento da sPLA2 com quercetina, sPLA2:CR01 aumentou em 27,8% a atividade miotóxica. Acredita-se que mudanças estruturais, observadas pelo espectro de fluorescência, tenham causado esse aumento, entretanto, estudos de docking ou cristalografia são necessários para melhor entender o tipo de interação entre o composto e a proteínas. No processo de co-incubação a sPLA2 apresentou uma diminuição de 16,2% [CR01(0,5 mg/mL)], sugerindo que o processo de pré-incubação foi o responsável pelo aumento da atividade miotóxica.

O presente trabalho mostrou que a hecogenina dependendo da dose pode inibir ou estimular a atividade enzimática da sPLA2 e não afetam de forma significativa os efeitos edematogênico e miotóxico.

6b– CONCLUSÃO

Os resultados apresentados, embora parciais, permite as seguintes conclusões:

- 1) O processo de pré-incubação da sPLA2 com hecogenina foi executado com êxito, já que modificações no perfil cromatográfico de massa foi observado.
- 2) O processo de pré-incubação com hecogenina não levou a modificações em nível de estrutura secundária, pois não foram observadas modificações no espectro de dicroísmo circular.
- 3) A pré-incubação com hecogenina levou a modificações em nível de estrutura terciária da proteína, já que houve uma diminuição na fluorescência, indicando uma menor exposição do triptofano na molécula
- 4) O processo de co-incubação apresenta melhor inibição nas atividades farmacológicas (edema e miotoxidade) do que o processo de pré-incubação
- 5) Para inibição da atividade enzimática, a pré-incubação é essencial para uma melhor performance do composto.
- 6) A hecogenina não apresenta potencial para um bom antiinflamatório, já que dependendo da dose, o composto pode inibir ou potencializar a atividade catalítica.

Bothrops pirajai

4.1 Purificação e tratamento químico da sPLA2.

Para purificação da sPLA2 desprovida de atividade catalítica (Lys49) purificada de *Bothrops pirajai* foi utilizado a combinação de cromatografia de troca iônica e de fase reversa. Primeiramente foi realizada a cromatografia de troca iônica usando uma coluna CM-5PW para separação da fração ácida existente no veneno (Figura 41). A coluna CM-5PW é composta por grupos de cargas negativas e por isso é conhecida como trocadora de cátions, sendo assim, não há interação das proteínas ácidas (com carga negativa) com a coluna sendo essas proteínas eluídas rapidamente no início da corrida.

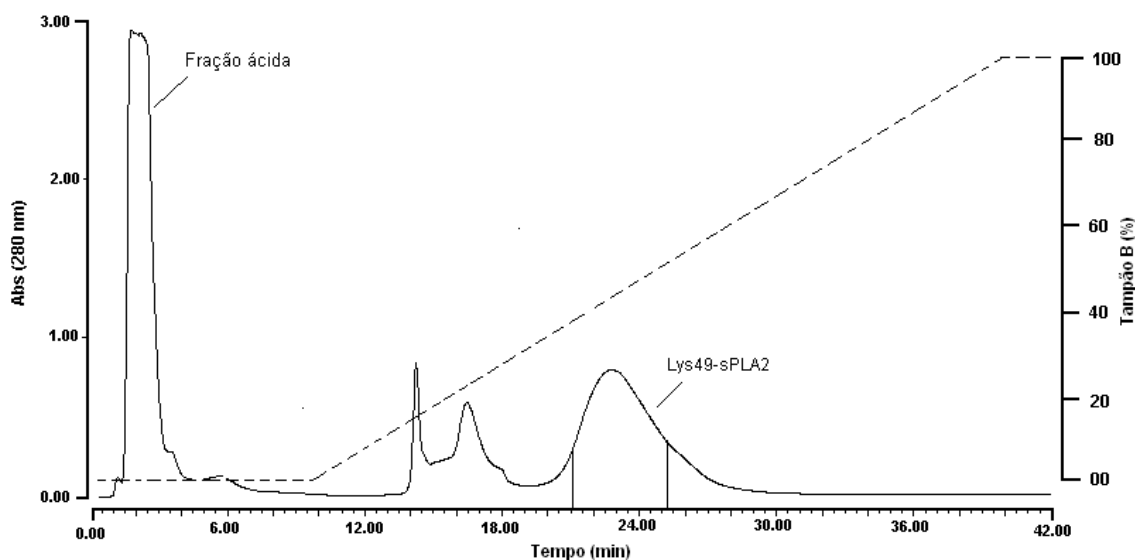


Figura 41: Perfil cromatográfico do veneno de *Bothrops pirajai* por troca iônica com coluna CM-5PW.

Após isolamento por troca iônica, a Lys49-sPLA2 I foi repurificada através de cromatografia de fase reversa com coluna C5 e em seguida tratada quimicamente com quercetina como descrito no item 3.3.4. Ambos os cromatogramas podem ser observados na Figura 42.

Como observado no cromatograma (Figura 42b), a ligação da quercetina com a sPLA2 causou mudanças na estrutura na proteína influenciando sua hidrofobicidade e conseqüentemente um leve deslocamento no tempo de retenção.

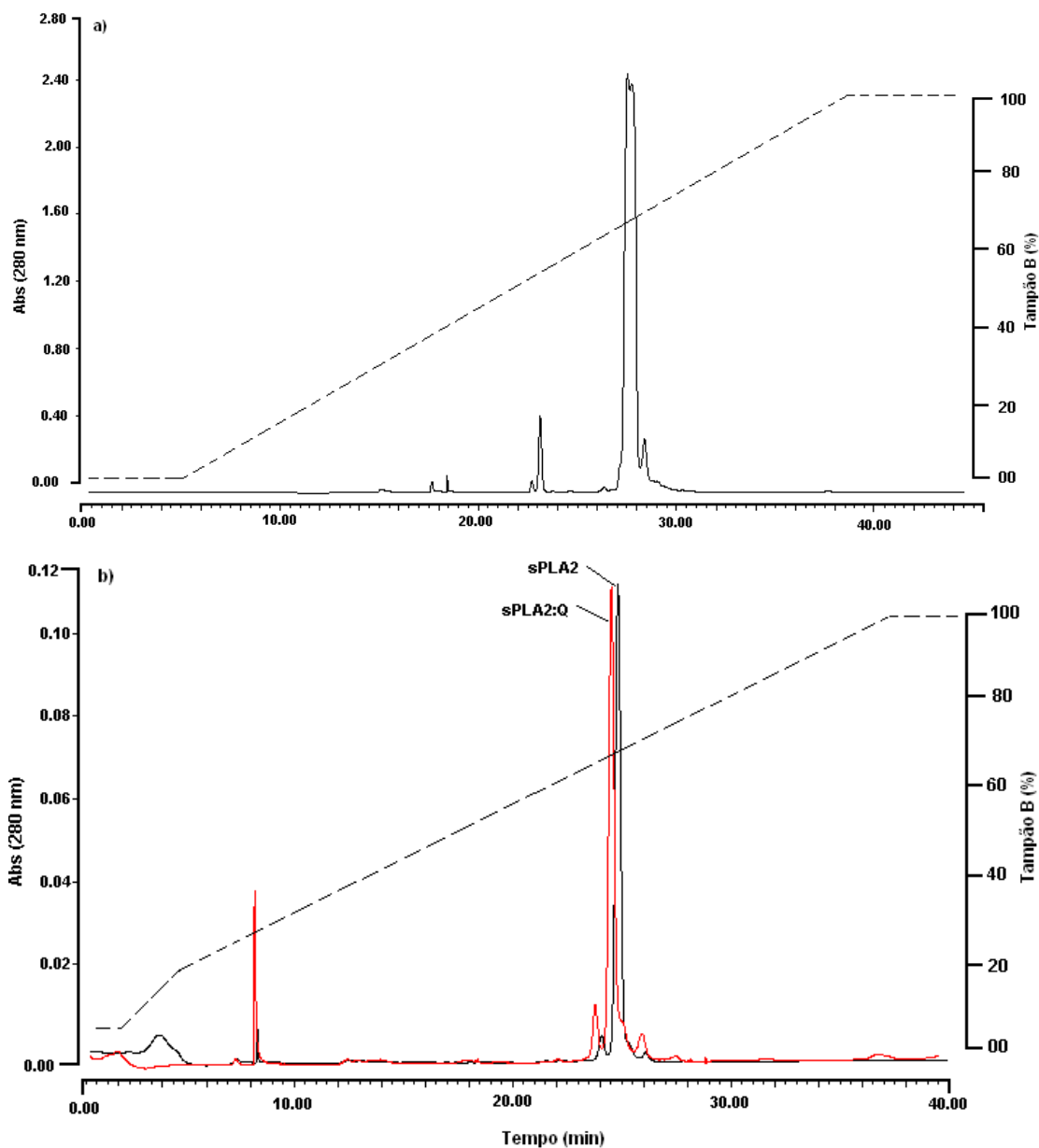


Figura 42: (a) Purificação da Lys49-sPLA2 por CLAE em fase reversa. (b) Perfil cromatográfico da Lys49-sPLA2 nativa sobreposto com o perfil de Lys49-sPLA2 previamente tratada com quercetina (sPLA2:Q)

4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil da massa molecular em PAGE-SDS, da fração de sPLA2 extraída do veneno de *Bothrops pirajai* está mostrado na Figura 43. Como observado, a Lys49-sPLA2 apresenta somente uma banda de massa molecular ~14 kDa, tanto em condições não reduzidas como em condições reduzidas com DTT.

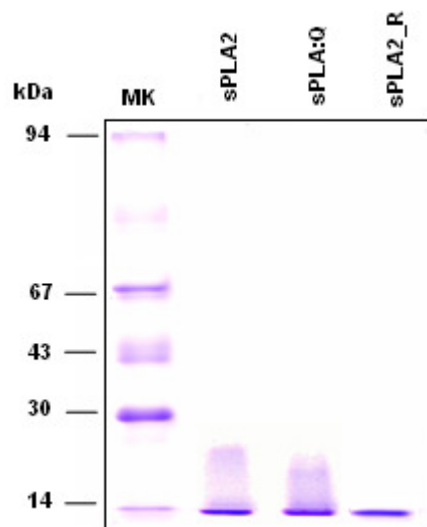


Figura 43: Perfil eletroforético das amostras de Ly49-sPLA2 nativa e sPLA2:Q nas condições normais e reduzidas (sPLA2_R).

4.3 Dicroísmo Circular (CD)

Com o objetivo de verificar possíveis modificações na estrutura secundária da Lys49-sPLA2 causada pelo pré-tratamento com quercetina foi realizada as medidas de dicroísmo circular. O perfil espectroscópico de CD da Lys49-sPLA2 nativa e sPLA2:Q de *Bothrops pirajai* está representado na Figura 44.

O espectro da Lys49-sPLA2, como observado para as outras modificações químicas, apresenta bandas características de α -hélice na região próximas a 208 e 220 nm. Não foi observada mudanças no espectro após pré incubação com quercetina, sugerindo que este composto não causa modificações na estrutura secundária da sPLA2.

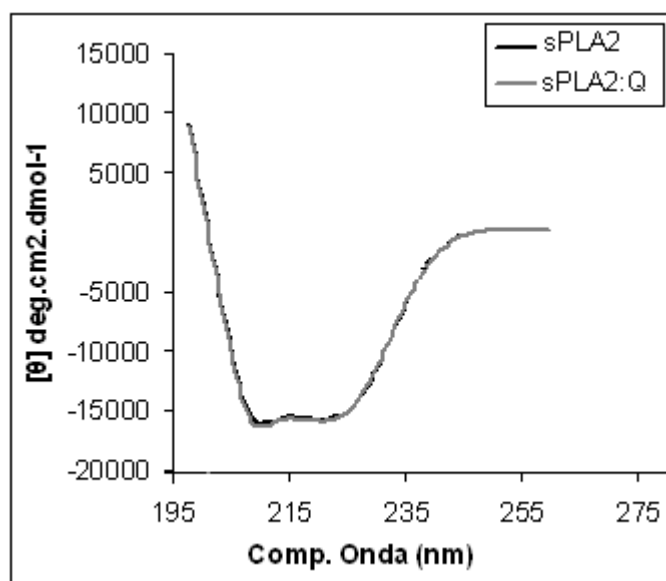


Figura 44: Perfil espectroscópico de dicroísmo circular de Lys49-sPLA2 e sPLA2:Q em meio aquoso. A concentração de ambas as proteínas foi de 15 μ M.

4.4 Estudos de Estabilidade Térmica

Além da avaliação nas alterações em nível de estrutura secundária da Lys49-sPLA2 nativa e sPLA2:Q, foram realizados experimentos para verificar a estabilidade térmica das proteínas. O objetivo desse experimento é utilizar o aumento gradativo da temperatura e associá-las com possíveis eventos de desenovelamento protéico. Desta forma, as amostras foram aquecidas de 20°C a 90°C com comprimento de onda de 222 nm e em seguida foram resfriadas as condições iniciais. A Figura 45a mostra o espectro obtido durante o aquecimento Lys49-sPLA2 e da sPLA2:Q, enquanto a Figura 45(b) o espectro de Lys49-sPLA2 e sPLA:Q durante o resfriamento.

A Figura 45a mostra que houve perda parcial da estrutural (desnaturação) durante o aquecimento de Lys49-sPLA2, porém essa desnaturação parcial é minimizada após tratamento químico com a quercetina, mostrando que a ligação do composto deixa a proteína mais estável frente a aumento na temperatura. Resultado interessante foi observado durante o resfriamento das proteínas. Como observado na Figura 45b, após aquecimento até

90°C a Lys49-sPLA2 é desnaturada, sendo esse processo irreversível, já que após resfriamento a 20°C a proteína continua na forma desnaturada. Entretanto, após tratamento químico com a quercetina, a sPLA2 praticamente recuperou sua forma inicial, mostrando que o tratamento com a quercetina causa modificações na estrutura da proteína deixando sua estrutura mais estável.

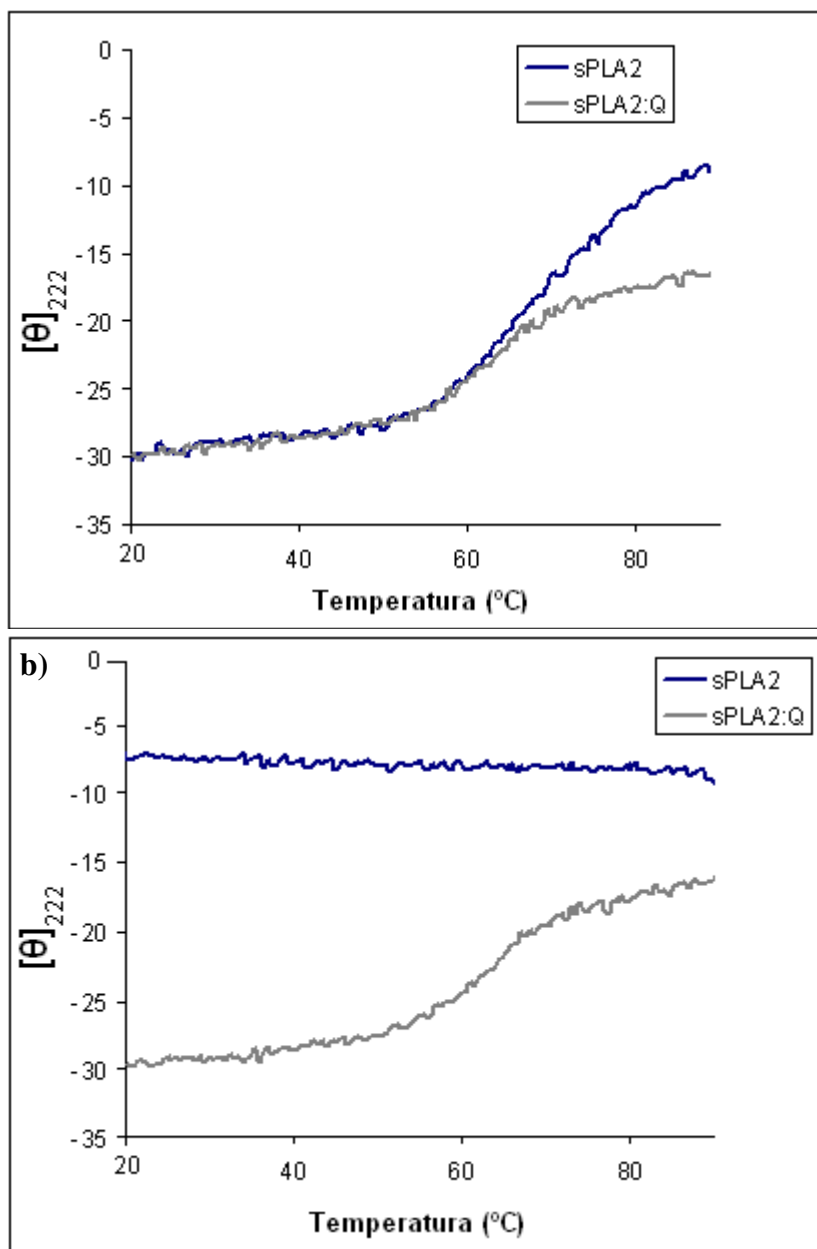


Figura 45: Espectros de estabilidade em função de variações na temperatura de Lys49-sPLA2 e sPLA2:Q (a) espectro de aquecimento; (b) espectro de resfriamento.

4.5 Fluorescência Intrínseca

Baseado na sensibilidade do triptofano em diferentes meios, ensaio de fluorescência foi realizado com o objetivo de avaliar mudanças na estrutura proteica de Lys49-sPLA2 causada pelo tratamento químico com quercetina. A Figura 46 mostra o espectro de fluorescência de Lys49-sPLA2, sPLA2:Q e quercetina.

Comparando os espectros da Lys49-sPLA2 e sPLA2:Q, pode-se observar uma maior intensidade na fluorescência do sPLA2:Q. Porém o espectro da quercetina pura mostra um pico de fluorescência próximo da região do triptofano. Esse resultado, como observado para a sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus*, indica que o aumento de fluorescência após tratamento com quercetina é devido ao composto e não a mudanças conformacionais na estrutura terciária da proteína causada pela quercetina.

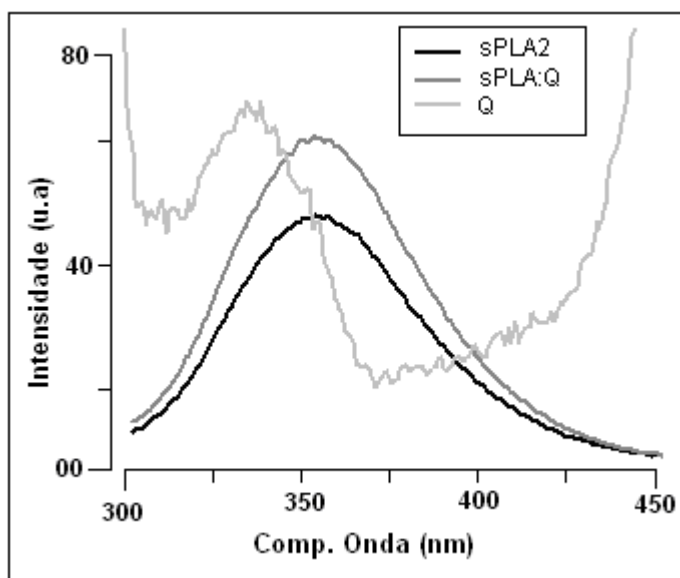


Figura 46: Espectro de emissão de fluorescência de Lys49-sPLA2 (*Bothrops pirajai*) e sPLA2:Q, á 52µM em água. Excitação de 280 nm.

4.6 Edema de Pata

Para avaliar a ação da quercetina sobre a atividade inflamatória da Lys49-sPLA2 de *Bothrops pirajai* verificou se a formação de edema em camundongos. Entretanto o processo de co-incubação ainda não foi realizado. Para a análise da pré-incubada de sPLA2 e quercetina foi injetada na pata direta dos camundongos 25µL de cada proteína

Como observado na figura 47, o edema causado pela sPLA2 nativa possui efeito máximo aos 30 minutos. Na presença de quercetina, pode-se observar que este composto potencializou a atividade edematogênica induzida pela sPLA2. No tempo de 180 minutos a atividade foi potencializada 1,4x, no tempo 240 minutos 2,3x enquanto que no tempo de 360 minutos foi de 2,7x.

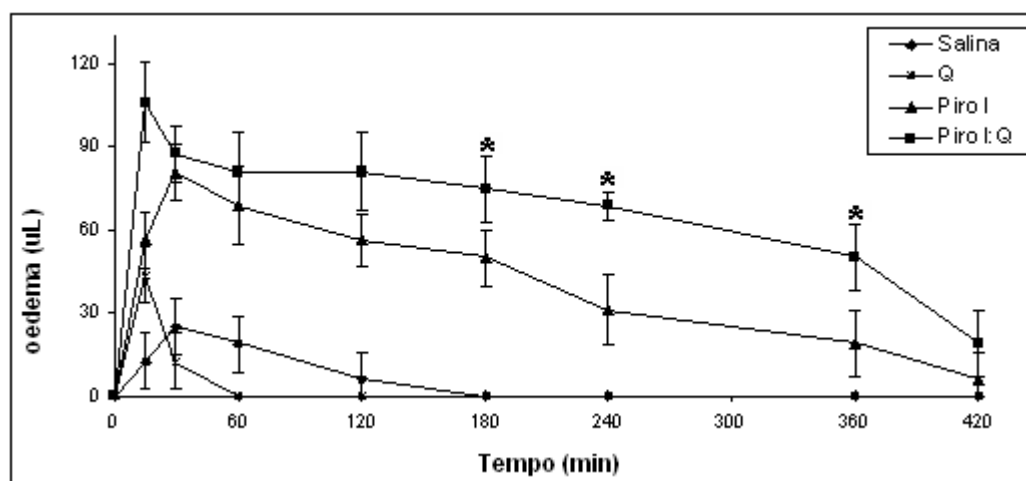


Figura 47: Formação do edema de pata após injeção de sPLA2 de *Bothrops pirajai* e sPLA2 pré incubada com quercetina. Barras de erro indicam EPM *P<0,05 comparado com atividade da sPLA2 (n=5).

4.7 Creatina Quinase – miotoxidade

Para avaliar o efeito da quercetina sobre a ação miotóxica da sPLA2 cataliticamente inativa, duas diferentes condições, como indicado no item 3.6.2 foram testadas. Primeiramente foi avaliada a ação da quercetina pela pré-incubação com a proteína. Desta

forma, foi injetado no músculo gastrocnêmio de camundongos 25 μ L de sPLA nativa (1 μ g/ μ L) e de sPLA2 pré-incubada com JU234 (1 μ g/ μ L).

Nesta primeira análise, foi observada uma pequena diminuição na atividade miotóxica da sPLA2 após tratamento prévio com quercetina (Figura 48). Enquanto sPLA2 nativa apresentou níveis de CK de $767,82 \pm 57,33$ U/L, sPLA2:Q apresentou de $675,93 \pm 58,53$ U/L, um diminuição de 12,0%. O resultado também indica como no caso da atividade edematogênica, que a ausência de atividade catalítica não abole o efeito miotóxico da proteína.

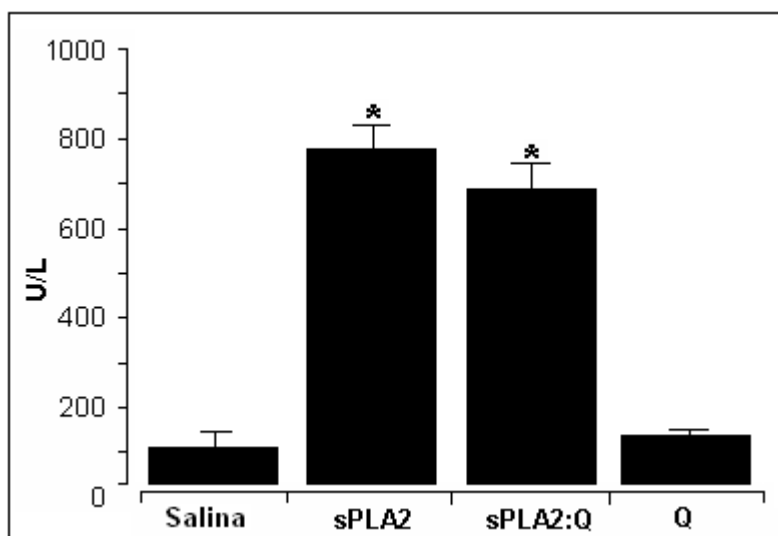


Figura 48: Ensaio de miotoxidade através dos níveis de creatina quinase. Diminuição de 12,0 % após pré-incubação com quercetina. EPM * $P < 0,05$ comparado com salina (n=5).

A segunda análise foi realizada a partir da co-incubação da sPLA2 com as concentrações de 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL de quercetina. Imediatamente após a incubação as amostras foram injetadas no músculo dos camundongos.

Na Figura 49, pode se observar que o efeito da quercetina na condição co-incubada também não obteve muito efeito sobre a sPLA2. De acordo com os resultados a sPLA2

apresentou $340,22 \pm 20,87$ U/L enquanto que a co-incubação com quercetina na concentração de 0,5 mg/mL [Q(0,5)] apresentou $306,47 \pm 18,53$ U/L, com Q(1,0) $291,73 \pm 18,07$ U/L e Q(2,0) $306,55 \pm 18,909$ U/L, uma diminuição de 9,92%, de 14,30% e 9,90% respectivamente.

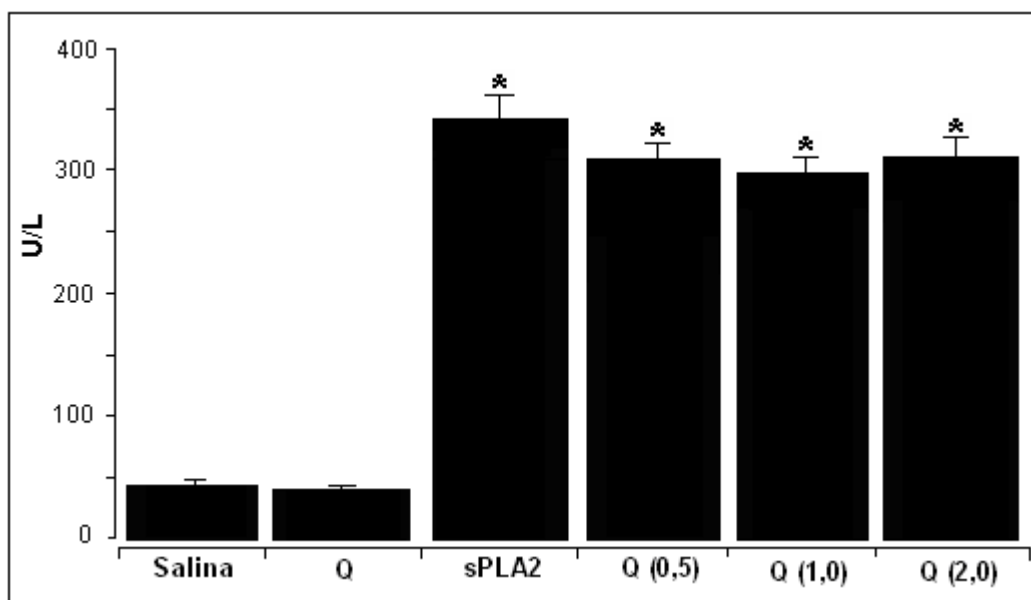


Figura 49: Miotoxidade após co-incubação da sPLA2 com quercetina nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. EPM *P<0,05 comparado com salina (n=5).

4.8 Agregação plaquetária

Para avaliar o efeito de quercetina sobre a habilidade de Lys49-sPLA2 induzir ou inibir a agregação plaquetária foi testada somente o processo de pré-incubação. A Figura 50(a) e 50(b) mostra a agregação plaquetária induzida pela sPLA2 de *Bothrops pirajai* nativa e sPLA2 tratada com quercetina, respectivamente, em três diferentes concentrações.

sPLA2 nativa mostrou baixa habilidade em induzir agregação quando comparado com sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus*, pois enquanto sPLA2 de *Cdt* induziu 70% de agregação na concentração de $15\mu\text{g}/\mu\text{L}$ sPLA2 de *Bothrops pirajai* induziu somente 16%

na concentração de $40\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Com relação a quercetina, pode se observar que a ação do composto foi praticamente nula sobre essa sPLA2, já que na concentração de $40\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a sPLA2 nativa induziu 16% de agregação enquanto que a sPLA2 com quercetina 13% e que na concentração de $25\mu\text{g}/\mu\text{L}$ foi 8% para sPLA2 nativa e 7% para a sPLA2:Q.

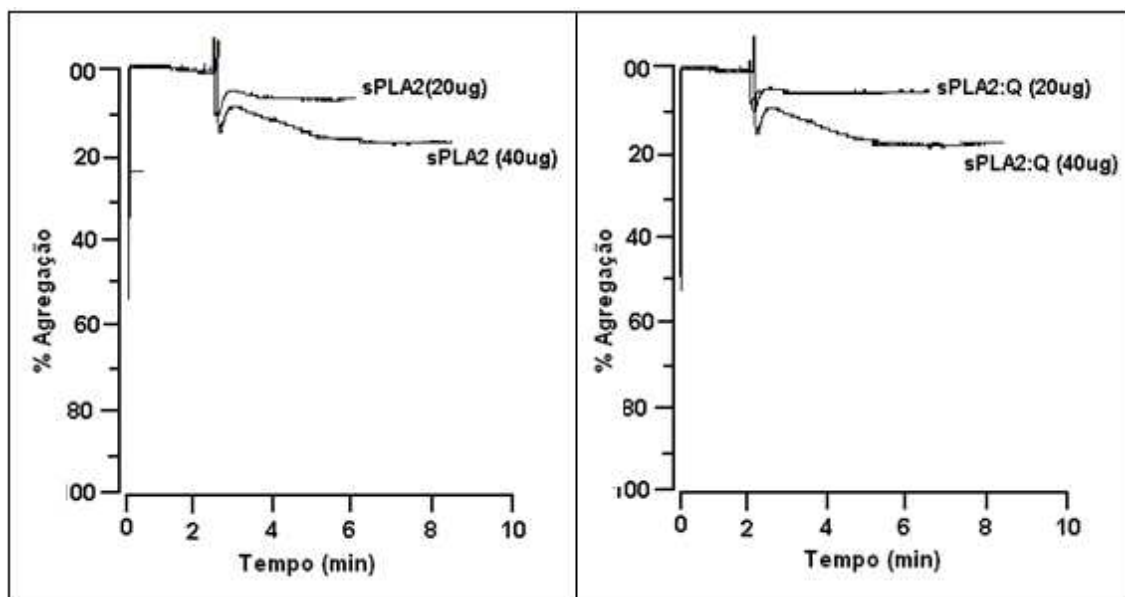


Figura 50: Ensaio de agregação plaquetária. (a) sPLA2 nativa; (b) sPLA2 com quercetina. Concentração das sPLA2: $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$

5c– DISCUSSÃO

Nesta parte do trabalho, uma sPLA2 cataliticamente inativa (Lys49) foi purificada do veneno de *Bothrops pirajai* e tratada quimicamente com a quercetina. Após o tratamento, análise de dicroísmo circular não mostrou modificação na estrutura secundária da proteína. Entretanto, uma grande modificação foi observada na estabilidade da proteína após tratamento com quercetina. Os resultados indicam que a altas temperaturas a Lys49-sPLA2 de *Bothrops pirajai* sofre uma desnaturação irreversível, porém essa desnaturação se torna reversível após tratamento com quercetina, sugerindo que ao interagir com proteína, a quercetina permite uma maior estabilidade de sua estrutura. Análise da fluorescência intrínseca do triptofano também foi realizada a fim de se observar mudanças em nível de estrutura terciária. Devido ao seu anel aromático, triptofano é geralmente encontrado parcialmente ou totalmente enterrado na parte hidrofobia da proteína, assim ele pode tornar-se mais ou menos exposto dependendo das condições do meio (Royer, 2006). Após tratamento com quercetina, foi observada um aumento no espectro de fluorescência, indicando mudanças na estrutura da proteína levando a uma maior exposição do resíduo de triptofano.

O tratamento com quercetina praticamente não causou mudanças na atividade enzimática da Lys49-sPLA2 (dados não mostrado), resultado esperado, uma vez que a presença deste ligante não é o fator responsável pela baixa atividade enzimática e sim a substituição de uma lisina na posição 49 ao invés de um ácido aspártico. Como sugerido por Ward (1998) a presença da Lys-49 impede a ligação do cálcio com a proteína, co-fator responsável para a atividade enzimática da sPLA2.

Desde a descoberta da sPLA2 cataliticamente inativa em 1984, muito se tem estudado para entender o mecanismo farmacológico que acompanha as Lys49. Em algumas serpentes, a hidrólise de fosfolipídios não é essencial para atividade farmacológica, sendo observada formação de edema e degranulação de mastócitos, mostrando uma dissociação entre a atividade catalítica e farmacológica (Teixeira, 2003). Esse fato foi reforçado através de modificações nos resíduos de His, Lys, Tyr e Trp de Lys49-PLA2 em que as atividades biológicas e catalítica foram afetadas em diferente extensão (Soares et al., 2001). Landucci et al., (1998), mostrou que uma sPLA2-Lys49 de *Bothrops jararacussu* induz edema de pata e de pele em camundongos, sem apresentar atividade catalítica.

Apesar da falta de atividade enzimática, a Lys49-sPLA2 apresentou formação de edema e que esse edema foi potencializado após tratamento com quercetina. Acreditamos que ao se ligar nessa sPLA2, a quercetina causa modificações na estrutura da proteína, deixando a região responsável pela formação de edema mais exposta e conseqüentemente levando ao aumento do edema.

Dentre as atividades farmacológicas, a de miotoxidade também apresenta independência da atividade catalítica (Gutierrez e Owby, 2003). Nossos resultados mostram que a Lys49-sPLA2 de *Bothrops pirajai* apresenta atividade miotóxica, sendo essa pouco alterada (diminuição de 12%) após tratamento com quercetina. O processo de co-incubação causou uma diminuição de 14,30%, sugerindo que o pré-tratamento não é fundamental para uma maior inibição da atividade.

A sPLA2 do veneno de serpente pode induzir ou inibir (Lu et al, 2002) a agregação plaquetária, ou mesmo induzir ou prevenir essa agregação, dependendo da concentração usada (Iatridis et al, 1976). Algumas sPLA2 cataliticamente inativas induzem forte

agregação plaquetária, provando que o sítio catalítico não é importante para esse efeito (Santos et al, 2007). Porém, algumas sPLA2 como BthTX-I (*Bothrops jararacussu*) e PrTX-II (*Bothrops piraji*) induzem uma baixa agregação (dos Santos et al., 2008). Os resultados mostraram que a Lys49-PLA2 nativa na dose de 40µg/µL induziu uma agregação baixa. O tratamento com quercetina não alterou os resultados de agregação, sugerindo que esse composto não interage com o sítio farmacológico referente à agregação plaquetária. Entretanto, pouco se tem na literatura sobre a agregação plaquetária dessa sPLA2, sendo necessário estudos complementares para melhor entender seu funcionamento.

6c– CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados nos permitem concluir que:

- 1) O processo de pré-incubação com quercetina causou modificações na estabilidade térmica da Lys49-sPLA2, deixando a estrutura mais estável em altas temperaturas. Além disso, quercetina tornou reversível a desnaturação da enzima.
- 2) Quercetina não afeta de maneira significativa os efeitos farmacológicos induzidos pela Lys49-sPLA2.
- 3) A quercetina tem maior efeito sobre a sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus* do que de *Bothrops piraji*.
- 4) Uso de polifenólicos similares podem agir como possíveis inibidores de sPLA2.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

S. Andrião-Escarso, A. Soares, V. Rodrigues, Y. Angulo, C. Diaz, B. Lomonte, J. Gutiérrez, J. Giglio, Myotoxic phospholipases A(2) in bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie* 82 (8) (2000) 755-763.

R. Arni, R. Ward, Phospholipase A2--a structural review. *Toxicon* 34(8) (1996) 827-841

T.M. Barbosa, P.M. Magalhães, V.P. Lopez, V. Neuparth, J.A. Duarte, Comparação da variação da actividade neuromuscular, da creatina quinase e da força isométrica máxima voluntária entre dois protocolos exaustivos e inabituais. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto* 3 (1) (2003) 7-15.

L. Bjeldanes, G. Chang, Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science* 197(4303) (1977) 577-578.

C. Bon, J. Changeux, T. Jeng, H. Fraenkel Conrat, Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *European Journal of Biochemistry* 99 (3) (1979) 471-481.

M. Borges, A. Soares, V. Rodrigues, S. Andrião-Escarso, H. Diniz, A. Hamaguchi, A. Quintero, S. Lizano, J. Gutiérrez, J. Giglio, M. Homsí-Brandeburgo, Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 127(1) (2000) 21-30

M. Borges, A. Soares, V. Rodrigues, F. Oliveira, A. Fransheschi, A. Rucavado, J. Giglio, M. Homsí-Brandeburgo, Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon* 39 (12) (2001) 1863-1869

F. Bourgaud, A. Gravot, S. Milesi, E. Gontier, Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161 (5) (2001) 839-851.

J. Burke, E. Dennis, Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther* 23(1) (2009) 49-59.

J.B. Calixto, Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência e Cultura*, 55 (3) (2003) 37-39.

D. Cardoso, M. Lopes-Ferreira, E. Faquim-Mauro, M. Macedo, S. Farsky, Role of crotoxin, a phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. *Mediators Inflamm* 10(3) (2001) 125-133.

V. Cechimel Filho, R.A. Yunes, Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceito sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova* 21 (1997) 99-105.

S. Chakraborti, Phospholipase A(2) isoforms: a perspective. *Cell Signal* 15(7) (2003) 637-665.

P. Chaurand, F. Luetzenkirchen, B. Spengler, Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry. *Journal of the american society for mass spectrometry* 10 (2) (1999) 91-103.

W Cho, F Kezdy. Chromogenic substrates and assay of phospholipases A2. *Methods in Enzymology* 197 (1991) 75-79.

C. Corbière, S. Battu, B. Liagre, P. Cardot, J. Beneytout, SdFFF monitoring of cellular apoptosis induction by diosgenin and different inducers in the human 1547 osteosarcoma cell line. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 808 (2) (2004) 255-262.

C. Corbiere, B. Liagre, A. Bianchi, K. Bordji, M. Dauca, P. Netter, J. Beneytout, Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. *International Journal of Oncology* 22 (4) (2003) 899-905.

D.H.A. Corrêa, C.H.I. Ramos, The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African Journal of Biochemistry Research*, 3 (2009) 164-173.

P. Costa, M. Toyama, S. Marangoni, L. Rodrigues-Simioni, M. da Cruz-Höfling, Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation. *Toxicon* 37 (8) (1999) 1143-1153.

B. Cummings, J. McHowat, R. Schnellmann, Phospholipase A(2)s in cell injury and death. *J Pharmacol Exp Ther* 294 (3) (2000) 793-799.

S. D'Auria, Fluorescence of proteins - Editorial overview, *Journal of Fluorescence* (2003) 1-1.

D. de Oliveira, M. Murakami, A. Cintra, J. Franco, S. Sampaio, R. Arni, Functional and structural analysis of two fibrinogen-activating enzymes isolated from the venoms of *Crotalus durissus terrificus* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 41(1) (2009) 21-29.

M. Debnath, M. Pandey, R. Sharma, G.S. Thakur, P. Lal, Biotechnological intervention of *Agave Sisalana*: A unique fiber yielding plant with medicinal property. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(3) (2010) 177-187.

E. Dennis, Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. J Biol Chem 269 (18) (1994) 13057-13060.

E. Dennis, Phospholipase A2 in eicosanoid generation. Am J Respir Crit Care Med 161 (2000) 32-35

M.J.S. Dewar, E.G. Zebisch, E.F. Healy, J.J.P. Stewart, Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model, J. Am. Chem. Soc. 107(13) (1985) 8.

B. Dhananjaya, C. D'Souza, The pharmacological role of nucleotidases in snake venoms. Cell Biochem Funct 28 (3) (2010) 171-177.

G. Di Carlo, N. Mascolo, A. Izzo, F. Capasso, Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sci 65 (4) (1999) 337-353.

C. Diaz, J. Gutierrez, B. Lomonte, J. Nunes, p-bromophenacyl bromide modification of *bothrops-asper* myotoxin-II, a lysine-49 phospholipase-a(2), affects its pharmacological activities. Toxicon 31 (9) (1993) 1202-1206.

R. Doley, R. Kini, Protein complexes in snake venom. Cell Mol Life Sci 66 (17) (2009) 2851-2871.

W.C. Dornas, T.T. Oliveira, R.G. Rodrigues-das-Dores, A.F. Santos, T.J. Nagem, Flavonóides: Potencial Terapêutico no estresse oxidativo. Rev. Ciências Farmac. Básica Apl., 28 (2008) 241-249

M.L. dos Santos, F.H.Fagundes, B.R. Teixeira, M.H. Toyama, M.H; R. Aparício, Purification and Preliminary Crystallographic Analysis of a New Lys49-PLA2 from *B. Jararacussu*. Int J Mol Sci., 9(5) (2008) 736-750.

J. Evangelista, A. Martins, N. Nascimento, C. Sousa, R. Alves, D. Toyama, M. Toyama, J. Evangelista, D. Menezes, M. Fonteles, M. Moraes, H. Monteiro, Renal and vascular effects of the natriuretic peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. Toxicon 52 (7) (2008) 737-744.

T.A. Fernandes, C.N. Aguiar, E.F. Daher, Envenenamento crotálico: epidemiologia, insuficiência renal aguda e outras manifestações químicas, Revista Eletrônica Pesquisa Médica 2(2) (2008) 1-10.

- L. Ferreira, O. Henriques, A. Andreoni, G. Vital, M. Campos, G. Habermehl, V. de Moraes, Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *Toxicon* 30 (10) (1992) 1211-1218.
- F. Fonseca, E. Antunes, R. Morganti, H. Monteiro, A. Martins, D. Toyama, S. Marangoni, M. Toyama, Characterization of a new platelet aggregating factor from crotoxin *Crotalus durissus cascavella* venom. *Protein J.* 25(3) (2006) 183-192.
- A. Fonteh, G. Atsumi, T. LaPorte, F. Chilton, Secretory phospholipase A2 receptor-mediated activation of cytosolic phospholipase A2 in murine bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* 165(5) (2000) 2773-2782.
- J. Formica, W. Regelson, Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids., *Food Chem Toxicol* 33(12) (1995) 1061-1080.
- A. Ghoghari, M. Rajani, Densitometric determination of hecogenin from *Agave americana* leaf using HPTLC. *Chromatographia* 62 (1-2) (2006) 113-116.
- B. Gil, M. Sanz, M. Terencio, M. Ferrandiz, G. Bustos, M. Paya, R. Gunasegaran, M. Alcaraz, Effects of flavonoids on naja-naja and human recombinant synovial phospholipases A(2) and inflammatory responses in mice. *Life Sciences* 54 (20) (1994) 333-338.
- B. Gil, M. Sanz, M. Terencio, R. Gunasegaran, M. Paya, M. Alcaraz, Morelloflavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholipase A(2) with anti-inflammatory activity. *Biochemical Pharmacology* 53 (7) (1997) 733-740.
- A. Giulietti, R. Harley, L. De Queiroz, M. Wanderley, C. Van den Berg, Biodiversity and conservation of plants in Brazil. *Conservation Biology* 19 (3) (2005) 632-639.
- P. Gopalakrishnakone, B. Hawgood, R. Theakston, Specificity of antibodies to the reconstituted crotoxin complex, from the venom of south-american rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, using enzyme-linked immunosorbent-assay (elisa) and double immunodiffusion. *Toxicon* 19 (1) (1981) 131-139
- O. Guclu-Ustundag, G. Mazza, Saponins: Properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47(3) (2007) 231-258
- J. Gutierrez, B. Lomonte, Phospholipase A2, myotoxins form Borhrops snake venoms, *Toxicon* 33(11) (1995) 1405-1424.
- J. Gutierrez, C. Ownby, Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A(2): insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity, *Toxicon* 42 (8) (2003) 915-931.

J. Gutiérrez, L. Ponce-Soto, S. Marangoni, B. Lomonte, Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A2: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue. *Toxicon* 51(1) (2008) 80-92

I. Halperin, B. Ma, H. Wolfson, R. Nussinov, Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins* 47(4) (2002) 409-443

R.A. Hendon, M. Fraenkel-Conrat, Biological Roles of the two components of crotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68 (7) (1971) 1560-1563.

M. Holzer, S. Mackessy, An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A(2). *Toxicon* 34 (10) (1996) 1149-1155.

S. Iatridis, P. Iatridis, S. Markidou, B. Ragatz, Inhibition of human platelet-aggregation by phospholipase A. *Thrombosis Research* 9(4) (1976) 335-344

C.V. Iglesias, R. Aparicio, L. Rodrigues-Simioni, E.A. Camargo, E. Antunes, S. Marangoni, D.O. Toyama, L.O. Berian, H.S. Monteiro, M.H. Toyama, Effects of morin on snake venom phospholipase A2 (PLA2). *Toxicon* 46(7) (2005) 751-758.

K. Ishii, T. Furuta, Y. Kasuya, High-performance liquid chromatographic determination of quercetin in human plasma and urine utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection. *Journal of chromatography B-analytical technologies in the biomedical and life sciences* 794 (1) (2003) 49-56.

S. Iwanaga, H. Takahashi, T. Suzuki, Proteinase inhibitors from the venom of Russell's viper. *Methods Enzymol* 45 (1976) 874-881.

G. Jones, P. Willett, R. Glen, A. Leach, R. Taylor, Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* 267(3) (1997) 727-748.

S.M. Kelly, N.C. Price, The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Current Protein and Peptide Science* 1(4) (2000) 349-384.

A. Kicman, M. Parkin, R. Iles, An introduction to mass spectrometry based proteomics - Detection and characterization of gonadotropins and related molecules. *Molecular and Cellular Endocrinology* (2007) 212-227.

H.P. Kim, H.T. Pham, V.A. Ziboh, Flavonoids differentially inhibit guinea pig epidermal cytosolic phospholipase A2. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 65 (5-6) (2001) 281-286.

R. Kini, H. Evans, Effects of snake venom proteins on blood platelets. *Toxicon* 28 (12) (1990) 1387-1422.

R. Kini, Y. Chan, Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A2 enzymes., *J Mol Evol* 48(2) (1999) 125-132.

R. Kini, Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon* 42 (8) (2003) 827-840.

M. Lacaille-Dubois, K. Galle, H. Wagner, Secoiridoids and xanthones from *Gentianella nitida*. *Planta Med* 62(4) (1996) 365-368

J.R. Lakowics, Principles of fluorescence spectroscopy, Kluwer Academic/Plenum Publishers (1999).

G. Lambeau, P. Ancian, J. Nicolas, L. Cupillard, E. Zvaritch, M. Lazdunski, A family of receptors for secretory phospholipases A2. *C R Seances Soc Biol Fil* 190(4) (1996) 425-435.

E. Landucci, R. Castro, M. Pereira, A. Cintra, J. Giglio, S. Marangoni, B. Oliveira, G. Cirino, E. Antunes, G. De Nucci, Mast cell degranulation induced by two phospholipase A2 homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur J Pharmacol* 343(2-3) (1998) 257-263.

M. Laskowski, Venom exonuclease, A.P. INC (Ed.). *The Enzymes*, New York (1971).

J. Lättig, M. Böhl, P. Fischer, S. Tischer, C. Tietböhl, M. Menschikowski, H. Gutzeit, P. Metz, M. Pisabarro, Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A2 by flavonoids: rationale for lead design. *J Comput Aided Mol Des* 21(8) (2007) 473-483.

W. Lee, M. Toyama, A. Soares, J. Giglio, S. Marangoni, I. Polikarpov, Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of piratoxin III, a D-49 phospholipase A2 from the venom of *Bothrops pirajai*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55(Pt 6) (1999) 1229-1230.

J. Lichtman, J. Conchello, Fluorescence microscopy. *Nat Methods* 2(12) (2005) 910-919.

M. Lindahl, C. Tagesson, Selective inhibition of group II phospholipase A2 by quercetin. *Inflammation* 17(5) (1993) 573-582.

M. Lindahl, C. Tagesson, Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. *Inflammation* 21(3) (1997) 347-356.

B. Lomonte, Y. Angulo, M. Sasa, J. Gutiérrez, The phospholipase A2 homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles. *Protein Pept Lett* 16(8) (2009) 860-876.

Q. Lu, Y. Jin, J. Wei, W. Wang, Y. Xiong, Biochemical and biological properties of *Trimeresurus jerdonii* venom and characterization of a platelet aggregation-inhibiting acidic phospholipase A2. *J Nat Toxins* 11(1) (2002) 25-33.

H.P.S. Makkar, P. Siddhuraju, K. Becker, *Plant Secondary Metabolites - Methods in Molecular Biology*, Humana Press (2007).

C. Manach, C. Morand, V. Crespy, C. Demigné, O. Texier, F. Régéat, C. Rémésy, Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett* 426 (3) (1998) 331-336.

L. Mancuso, M. Correa, C. Vieira, O. Cunha, J. Lachat, H. de Araujo, C. Ownby, J. Giglio, Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. *Toxicon* 33(5) (1995) 615-626.

J. Maraganore, G. Merutka, W. Cho, W. Welches, F. Kézdy, R. Heinrikson, A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. *J Biol Chem* 259(22) (1984) 13839-13843.

D. Marchi-Salvador, L. Corrêa, G. Salvador, A. Magro, C. Oliveira, J. Iulek, A. Soares, M. Fontes, Preliminary X-ray crystallographic studies of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom., *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 63(Pt 12) (2007) 1067-1069.

D. Marchi-Salvador, C. Fernandes, L. Silveira, A. Soares, M. Fontes, Crystal structure of a phospholipase A(2) homolog complexed with p-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity. *Biochim Biophys Acta* 1794(11) (2009) 1583-1590

F. Markland, Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36(12) (1998) 1749-1800.

N. Marsh, V. Williams, Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon* 45(8) (2005) 1171-1181.

W. Martz, Plants with a reputation against snakebite. *Toxicon* 30(10) (1992) 1131-1142.

R. McLean, E. Massaro, W. Elliott, A comparative study of the homology of certain enzymes in elapid venoms. *Comp Biochem Physiol B* 39(4) (1971) 1023-1037.

D. Mebs, Proteolytic activity of the bird spider venom. *Naturwissenschaften* 57(6) (1970) 308.

J. Meier, K.F. Stocker, Biological and distribution of venomous snakes of medical importance and composition of snake venoms. Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons, CrC Press, Flórida, (1995).

A. Meister, Biochemistry of amino acid. New York, London: Academic Press (1965).

K. Meyer, P. Kiffman, A. Linker, Hyaluronidases. Boyer, P.D., Lardy, H., Myrback, K. (ed). The Enzymes, Academic Press 4 (1960).

R. Mittermeier, G. Da Fonseca, A. Rylands, K. Brandon, A brief history of biodiversity conservation in Brazil. Conservation Biology 19 (3) (2005) 601-607

E. Miyabara, R. Tostes, H. Selistre-de-Araújo, M. Aoki, A. Moriscot, Role of nitric oxide in myotoxic activity induced by crotoxin in vivo. Toxicon 43(4) (2004) 425-432.

R. Mora, B. Valverde, C. Díaz, B. Lomonte, J. Gutiérrez, A Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. Toxicon 45(5) (2005) 651-660.

W. Mors, M. do Nascimento, B. Pereira, N. Pereira, Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. Phytochemistry 55 (6) (2000) 627-642.

A. Mukhopadhyay, P. Stahl, Bee venom phospholipase A2 is recognized by the macrophage mannose receptor. Arch Biochem Biophys 324(1) (1995) 78-84.

M.G. Mulkerrin, Protein Structure Analysis Using Circular Dichroism, E. H.A Havel (Ed.), Spectroscopic Method for Determining Structure Proteins in Solution, VCH Publisher, New York (1996) 5-27.

M. Murakami, I. Kudol, Phospholipase A2. J. Biochem 131 (3) (2002) 285-292.

A. Narula, S. Kumar, P. Srivastava, Genetic fidelity of in vitro regenerants, encapsulation of shoot tips and high diosgenin content in *Dioscorea bulbifera* L., a potential alternative source of diosgenin. Biotechnology Letters 29 (4) (2007) 623-629.

T. Nevalainen, G. Graham, K. Scott, Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review. Biochim Biophys Acta 1781(1-2) (2008) 1-9.

R. Newman, J. Vidal, L. Viskatis, J. Johnson, Etcheverry M: Vrctc-310 - a novel compound of purified animal toxins separates antitumor efficacy from neurotoxicity. Investigational New Drugs (1993) 151-159.

M. Noroozi, W. Angerson, M. Lean, Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. Am J Clin Nutr 67(6) (1998) 1210-1218.

J.A. Nunes Moreira, N.E. Macedo Beltrão, O.R.R. Ferreira da Silva, O Agronegócio do sisal no Brasil (1999).

K. Oda, H. Matsuda, T. Murakami, S. Katayama, T. Ohgitani, M. Yoshikawa, Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biol Chem* 381(1) (2000) 67-74.

D. Oliveira, M. Toyama, J. Novello, L. Beriam, S. Marangoni, Structural and functional characterization of basic PLA2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *J Protein Chem* 21(3) (2002) 161-168.

J. Perales, C. Villela, G. Domont, V. Choumet, B. Saliou, H. Moussatché, C. Bon, G. Faure, Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. *Eur J Biochem* 227(1-2) (1995) 19-26.

J. Pérez-Díaz, J. Vega-Baez, J. Sandoval-Ramírez, S. Meza-Reyes, S. Montiel-Smith, N. Farfán, R. Santillan, Novel steroidal penta- and hexacyclic compounds derived from 12-oxospirostan sapogenins. *Steroids* 75 (13-14) (2010) 1127-1136.

N. Petrovic, C. Grove, P. Langton, N. Misso, P. Thompson, A simple assay for a human serum phospholipase A2 that is associated with high-density lipoproteins. *J Lipid Res* 42 (10) (2001) 1706-1713.

P. Pietta, Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63(7) (2000) 1035-1042.

F.M.O. Pinho, I.D. Pereira, Ofidismo. *Rev. Ass. Med. Brasil* 47(1) (2001) 24-29.

L. Ponce-Soto, B. Lomonte, J. Gutiérrez, L. Rodrigues-Simioni, J. Novello, S. Marangoni, Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochim Biophys Acta* 1770(4) (2007) 585-593.

M. Radomski, S. Moncada, An improved method for washing of human-platelets with prostacyclin. *Thrombosis Research* 30 (40) (1983) 83-89.

S. Rates, Plants as source of drugs. *Toxicon* 39(5) (2001) 603-613.

L.A. Ribeiro, M.T. Jorge, Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3139 casos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 30 (6) (1997) 475-480.

C. Royer, Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence. *Chem Rev* 106(5) (2006) 1769-1784.

S. Sampaio, S. Hyslop, M. Fontes, J. Prado-Franceschi, V. Zambelli, A. Magro, P. Brigatte, V. Gutierrez, Y. Cury, Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. *Toxicon* 55(6) (2010) 1045-1060.

R. Samy, R. Gopalakrishnakone, B. Ho, V. Chow, Purification, characterization and bactericidal activities of basic phospholipase A(2) from the venom of *Agkistrodon halys* (Chinese pallas). *Biochimie* 90(9) (2008) 1372-1388.

I. Sano-Martins, S. Tomy, D. Campolina, M. Dias, S. de Castro, M. de Sousa-e-Silva, C. Amaral, N. Rezende, A. Kamiguti, D. Warrell, R. Theakston, Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. *Qjm-an International Journal of Medicine* 94(10) (2001) 551-559.

K. Santos, M. Murakami, A. Cintra, M. Toyama, S. Marangoni, V. Forrer, J. Neto, I. Polikarpov, R. Arni, Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the heterodimeric crotoxin complex and the isolated subunits crotoxin and phospholipase A(2). *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* 63(4) (2007) 287-290.

E.P. Schenkel, G. Gosmann, P.R. Petrovick, Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. Porto Alegre (Ed.), Farmacognosia: da planta ao medicamento (1999).

D. Scott, P. Sigler, Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A2. *Adv Protein Chem* 45 (1994) 53-88.

M.A.S. Silva, Variabilidade genética e fitoquímica da população do Cerrado e Mata Atlântica da Casearia, Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Botucatu (2003)

C.M.O. Simões, Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre / Florianópolis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Universidade Federal de Santa Catarina (2000)

C.H. Slotta, M. Fraenkel-Conrat, Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. *Mem. Inst. Butantan* 12 (1938) 505-513.

A. Soares, A. Mancin, A. Cecchini, E. Arantes, S. Franca, J. Gutierrez, J. Giglio, Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A(2) subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33(9) (2001) 877-888.

A. Soares, J. Giglio, Chemical modifications of phospholipases A(2) from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties, *Toxicon* 48(2) (2003) 855-868.

A. Soares, M. Fontes, J. Giglio, Phospholipase A(2) myotoxins from *Bothrops* snake venoms: Structure-function relationship. *Current Organic Chemistry* 8(17) (2004) 1677-1690.

A. Soares, F. Ticli, S. Marcussi, M. Lourenco, A. Januario, S. Sampaio, J. Giglio, B. Lomonte, P. Pereira, Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. *Current Medicinal Chemistry* 12(22) (2005) 2625-2641.

R. Stabeli, S. Amui, C. Sant'Ana, M. Pires, A. Nornizo, M. Monteiro, P. Romao, R. Guerra-Sa, C. Vieira, J. Giglio, M. Fontes, A. Soares, *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A(2) homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 142 (3-4) (2006) 371-381.

D. Tang, R. Kang, W. Xiao, H. Zhang, M. Lotze, H. Wang, X. Xiao, Quercetin Prevents LPS-Induced High-Mobility Group Box 1 Release and Proinflammatory Function. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 41(6) (2009) 651-660.

C. Teixeira, E. Landucci, E. Antunes, M. Chacur, Y. Cury, Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. *Toxicon* 42(8) (2003) 947-962.

D.O. Toyama, S. Marangoni, E.B.S. Diz-Filho, S.C.B. Oliveira, M.H. Toyama, Effect of umbelliferone (7-hydroxycoumarin, 7-HOC) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A2 (sPLA2) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *Toxicon* 53(4) (2009) 417-426

M.H. Toyama, L. Mancuso, J. Giglio, J. Novello, B. Oliveira, S. Marangoni, A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins-I and II, two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom. N-terminal sequencing. *Biochem Mol Biol Int* 37(6) (1995) 1047-1055.

M.H. Toyama, A. Soares, C. Vieira, J. Novello, B. Oliveira, J. Giglio, S. Marangoni, Amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin from *Bothrops pirajai* snake venom, and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide. *J Protein Chem* 17(7) (1998) 713-718.

M.H. Toyama, P. Costa, J. Novello, B. de Oliveira, J. Giglio, M. da Cruz-Höfling, S. Marangoni, Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49 phospholipase A2 from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin with moderate PLA2 and anticoagulant activities and high myotoxic activity., *J Protein Chem* 18(3) (1999) 371-378.

M.H. Toyama, E. Carneiro, S. Marangoni, R. Barbosa, G. Corso, A. Boschero, Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their

action on insulin secretion by pancreatic islets. *Biochim Biophys Acta* 1474(1) (2000) 56-60.

M.H. Toyama, D. de Oliveira, L. Beriam, J. Novello, L. Rodrigues-Simioni, S. Marangoni, Structural, enzymatic and biological properties of new PLA(2) isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom., *Toxicon* 41(8) (2003) 1033-1038.

M.H. Toyama, D.O. Toyama, L. Passero, M. Laurenti, C. Corbett, T. Tomokane, F. Fonseca, E. Antunes, P. Joazeiro, L. Beriam, M. Martins, H. Monteiro, M. Fonteles, Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon* 47(1) (2006) 47-57.

P. Trouillas, C. Corbière, B. Liagre, J. Duroux, J. Beneytout, Structure-function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. *Bioorg Med Chem* 13(4) (2005) 1141-1149.

A.T. Tu, Blood coagulation, *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc, New York (1977).

A.T. Tu, Hemorrhage induced by Snake Venoms. *Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi* 81 (1982) 807-818.

E. Valentin, G. Lambeau, Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1488(1-2) (2000) 59-70.

H. Verheij, J. Volwerk, E. Jansen, W. Puyk, B. Dijkstra, J. Drenth, G. de Haas, Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A2. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. *Biochemistry* 19(4) (1980) 743-750.

J. Vivian, P. Callis, Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys J* 80(5) (2001) 2093-2109.

R. Ward, W.J. de Azevedo, R. Arni, At the interface: crystal structures of phospholipases A2. *Toxicon* 36(11) (1998) 1623-1633.

H. Weiss, B. Lages, Platelet prothrombinase activity and intracellular calcium responses in patients with storage pool deficiency, glycoprotein IIb-IIIa deficiency, or impaired platelet coagulant activity--a comparison with Scott syndrome. *Blood* 89(5) (1997) 1599-1611.

J. Williams, H. Gong, Biological activities and syntheses of steroidal saponins: the shark-repelling pavoninins. *Lipids* 42(1) (2007) 77-86.

Y. Yamazaki, Y. Tokunaga, K. Takani, T. Morita, C-terminal heparin-binding peptide of snake venom VEGF specifically blocks VEGF-stimulated endothelial cell proliferation. *Pathophysiol Haemost Thromb* 34(4-5) (2005) 197-199.

C. Yang, Structure-function relationship of phospholipase A2 from snake-venoms. *Toxin Reviews* 13(2) (1994) 125-177.

K. Yang, S. Lamprecht, Y. Liu, H. Shinozaki, K. Fan, D. Leung, H. Newmark, V. Steele, G. Kelloff, M. Lipkin, Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis* 21(9) (2000) 1655-1660.

M. Yen, J. Su, C. Chien, K. Tseng, C. Yang, W. Chen, C. Chang, M. Kuo, Diosgenin induces hypoxia-inducible factor-1 activation and angiogenesis through estrogen receptor-related phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in osteoblasts. *Mol Pharmacol* 68(4) (2005) 1061-1073.

H. Zhao, L. Tang, X. Wang, Y. Zhou, Z. Lin, Structure of a snake venom phospholipase A2 modified by p-bromo-phenacyl-bromide. *Toxicon* 36(6) (1998) 875-886.

8 – APÊNDICES

8.1 Comitê de Ética

8.2 Publicações

COTRIM, C.A; OLIVEIRA, S.C.B; DIZ FILHO, E.B.S; FONSECA, F.V; BALDISSERA Jr, L; ANTUNES, E; XIMENES, R.M; MONTEIRO, H.S.A; RABELLO, M.M; HERNANDES, M.Z; TOYAMA, D.O; TOYAMA, M.H. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2. *Chemico-Biological Interactions*, v 189 (1-2), p. 9-16, 2011.

SANTOS, M.L; TOYAMA, D.O; OLIVEIRA, S.C.B; COTRIM, C.A; DIZ-FILHO, E.B; FAGUNDES, F.H; SOARES, V.C; APARICIO, R; TOYAMA, M.H. Modulation of the pharmacological activities of secretory phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* induced by naringin. *Molecules*, v 16 (1), p. 738-761, 2011.

FONSECA, F.V; BALDISSERA Jr, L.; CAMARGO, E.A; DIZ-FILHO, E.B.S; CORRÊA, A.G; BERIAM, L.O.S, TOYAMA, D.O; COTRIM, C.A; TOYAMA, M.H. Effect of the synthetic coumarin, ethyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate on activity of *Crotalus durissus ruruima* sPLA2 as well as on edema and platelet aggregation induced by this factor. *Toxicon* (Oxford), v 55, p. 1527-1530, 2010.



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

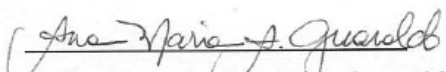
CERTIFICADO

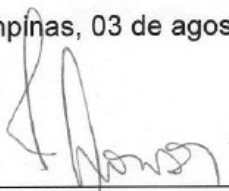
Certificamos que o Protocolo nº 1916-1, sobre "Avaliação dos efeitos de compostos polifenólicos sobre a atividade farmacológica e biológica induzida por sPLA2s isoladas de venenos crotálicos e botrópicos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama / Camila Aparecida Cotrim, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 03 de agosto de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1916-1, entitled "Evaluation of the effects of polyphenolic compounds on the biological and pharmacological activity induced by sPLA2s isolated from crotalic and bothropic venoms", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on August 3, 2009.

Campinas, 03 de agosto de 2009.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>



Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2

Camila Aparecida Cotrim^{a,*}, Simone Cristina Buzzo de Oliveira^a, Eduardo B.S. Diz Filho^a, Fabiana Vieira Fonseca^a, Lineu Baldissera Jr.^b, Edson Antunes^b, Rafael Matos Ximenes^c, Helena Serra Azul Monteiro^c, Marcelo Montenegro Rabello^d, Marcelo Zaldini Hernandez^d, Daniela de Oliveira Toyama^e, Marcos Hikari Toyama^f

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

^b Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

^c Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas (LAFAVET), Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^d Laboratório de Química Teórica Medicinal – LQTM, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^e Universidade Presbiteriana Mackenzie, CCBS, São Paulo, Brazil

^f Campus Experimental do Litoral Paulista – UNESP, São Vicente, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 July 2010

Received in revised form 27 October 2010

Accepted 29 October 2010

Available online 4 November 2010

Keywords:

sPLA

Crotalus durissus terrificus

Quercetin

Pharmacological sites

Molecular docking

ABSTRACT

As polyphenolic compounds isolated from plants extracts, flavonoids have been applied to various pharmaceutical uses in recent decades due to their anti-inflammatory, cancer preventive, and cardiovascular protective activities. In this study, we evaluated the effects of the flavonoid quercetin on *Crotalus durissus terrificus* secretory phospholipase A2 (sPLA2), an important protein involved in the release of arachidonic acid from phospholipid membranes. The protein was chemically modified by treatment with quercetin, which results in modifications in the secondary structure as evidenced through circular dichroism. In addition, quercetin was able to inhibit the enzymatic activity and some pharmacological activities of sPLA2, including its antibacterial activity, its ability to induce platelet aggregation, and its myotoxicity by approximately 40%, but was not able to reduce the inflammatory and neurotoxic activities of sPLA2. These results suggest the existence of two pharmacological sites in the protein, one that is correlated with the enzymatic site and another that is distinct from it. We also performed molecular docking to better understand the possible interactions between quercetin and sPLA2. Our docking data showed the existence of hydrogen-bonded, polar interactions and hydrophobic interactions, suggesting that other flavonoids with similar structures could bind to sPLA2. Further research is warranted to investigate the potential use of flavonoids as sPLA2 inhibitors.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Phospholipases A2 (PLA2, EC 3.1.1.4) are small proteins that catalyze the hydrolysis of glycerophospholipids at the sn-2 position in a Ca²⁺-dependent reaction, releasing lysophospholipids and fatty acids [1–3]. These enzymes are the main component of snake venom and have been investigated not only because they have a wide range of biological effects, but also due to their similar-

ity to mammalian phospholipases [4,5]. However, in contrast to their mammalian counterparts, several snake venom PLA2s are toxins that induce pharmacological effects [6] through arachidonic acid metabolism leading to the production of various lipid pro-inflammatory mediators such as prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes [7]. Recent studies have shown that inhibition of cytosolic PLA2 (cPLA2) leads to a decrease in eicosanoid levels and, reduced inflammation [8].

Due to the role of PLA2s in the inflammatory process, there is pharmacological interest in PLA2 inhibitors, and among these, the flavonoids have been successfully studied. Flavonoids are widely produced in plants tissues making them suitable targets for pharmaceutical extraction and chemical synthesis [8,9]. The inhibitory effect of flavonoids on secretory PLA2 (sPLA2) was reported by Gil et al. [10], and Lindahl and Tagesson [11]. Their results showed that inhibition of sPLA2 from different sources following incubation with various flavonoids is dependent on the 5-hydroxyl group as well as the double bond and the double-bonded oxygen in the oxane ring, and that the hydroxyl groups at the 3'- and 4'-

* Corresponding author at: Instituto de Biologia – UNICAMP, Rua Monteiro Lobato, 255 – Cidade Universitária Zeferino Vaz, Zip Code: 13083-862, Campinas, SP, Brazil. Tel.: +55 19 3521 6132.

E-mail addresses: camil_cotrim@yahoo.com.br (C.A. Cotrim), simonebuzzo@hotmail.com (S.C.B. de Oliveira), eduardodizfilho@gmail.com (E.B.S. Diz Filho), fvmacieira@yahoo.com.br (F.V. Fonseca), libajunior@hotmail.com (L. Baldissera Jr.), edson.antunes@uol.com.br (E. Antunes), rmximenes@hotmail.com (R.M. Ximenes), hsazul@gmail.com (H.S.A. Monteiro), marcelorabello@globo.com (M.M. Rabello), zaldini@ufpe.br (M.Z. Hernandez), gaveiraf@mackenzie.br (D. de Oliveira Toyama), mhtjpn@yahoo.com (M.H. Toyama).

position are required for selective inhibition of PLA2 [11]. However, the exact mechanism by which flavonoids inhibit PLA2 remains unclear. Iglesias et al. [12] showed that morin modifies the secondary structure of sPLA2 from *Crotalus durissus cascavella* venom, but did not significantly affect its pharmacological activities.

Although there are studies of flavonoids as PLA2 inhibitors, the mode of binding of flavonoids to PLA2 as well as their inhibitory mechanism is still not clear. The aims of this article are to investigate the effect of quercetin, a widely spread flavonoid, on the structure and function of a sPLA2 isolated from *Crotalus durissus terrificus*, to increase our understanding of the mode action of polyphenolic compounds on the snake venoms, and to evaluate therapeutic application against the symptoms caused by snake bites. In the last decades the action of quercetin on the PLA2 has been studied. In 1993 Lindahl and Tagesson [13] showed that quercetin is a potent inhibitor of PLA2 (group II) from *Vipera russuli*. In addition, Lättig et al. [8] showed through computational studies chemical interactions between humans' sPLA2 and quercetin. Due to these characteristics, quercetin has been chosen as flavonoid model. Moreover we also propose, through high-resolution three-dimensional (3D) data (molecular docking), a structural model for understanding the molecular interactions between sPLA2 and quercetin, and how it can influence enzymatic and pharmacological activities of sPLA2.

2. Materials and methods

2.1. Venom, animals and reagents

C. durissus terrificus venom was purchased from Bio-Agents Serpentarium (Batatais, São Paulo, Brazil). Analytical HPLC- and sequencing-grade solutes and solvents were purchased from various suppliers (Bio Rad, Sigma Aldrich, Boehringer Mannheim, and Applied Biosystems). Female Swiss mice (18–20 g) used in the pharmacological assays were obtained from the Multidisciplinary Center of Biological Investigations (CEMIB-UNICAMP) and male chicks were obtained from Itu farm in Campinas City. All animal experiments were approved by the Ethics Committee of State University of Campinas (São Paulo, Brazil) under the number 1916-1.

2.2. Purification of sPLA2

Whole *C. durissus terrificus* venom was first fractionated as previously described by Toyama et al. [14]. Dried venom (45 mg) was dissolved in ammonium bicarbonate buffer (1.0 M; pH 8.0) and clarified by centrifugation ($4500 \times g$ for 1 min). The sPLA2 from *C. durissus terrificus* was eluted using a non-linear gradient of acetonitrile 66% in 0.1% of trifluoroacetic acid (TFA) by reverse-phase chromatography using a Supelco C5 column (0.10 cm $\times$ 25 cm) with flow rate of 1 mL/min with absorbance monitoring at 280 nm. The resulting PLA2 was termed sPLA2 and its purity was evaluated by SDS-PAGE.

2.3. Incubation of sPLA2 with quercetin and purification of modified sPLA2

The incubation of sPLA2 with quercetin (mol:mol) was according to the procedure described by Zhao et al. [15]. Quercetin was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), and its concentration never exceeded 1% during incubation. Quercetin (400 μ L of a 0.1 mM solution) was added to 400 μ L of a homogenized, purified sPLA2 solution (1 mg/mL). The mixture was incubated for 90 min at room temperature, and 200- μ L samples of this mixture were loaded onto a preparative reverse-phase column to separate the treated enzyme (sPLA2:Q) from quercetin. After column equilibration with HPLC buffer A (aqueous 0.1% TFA), samples were eluted

using a discontinuous gradient of HPLC buffer B (66.6% of acetonitrile in 0.1% TFA) at a constant flow rate of 1.0 mL/min. The chromatographic run was monitored at 280 nm.

2.4. Electrophoresis

Electrophoresis was carried out following the Laemmli method [16]. The degree of purity of fractions was assessed by discontinuous electrophoresis using a final acrylamide concentration of 12.5% in the resolving gels (1.0 M Tris-HCl, pH 8.8) and 5% in the stacking gel (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8). Electrophoretic separation was carried out in a 250 Mighty Small (Hoefer Scientific Instruments) for SDS-PAGE. All samples and the molecular marker were treated with SDS and 1.0 M dithiothreitol (DTT), and the run was conducted at 60 mA for stacking gel and 90 mA for running gel. After electrophoresis, samples were stained with Coomassie brilliant blue R-250.

2.5. Circular dichroism spectroscopy

sPLA2 and sPLA2:Q (sPLA2 + quercetin) were dissolved in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and final protein concentrations were adjusted to 8.7 mM. After centrifugation at $4000 \times g$ for 5 min, samples were transferred to a 1-mm path length quartz cuvette. Circular dichroism spectra in the wavelength range 185–300 nm were acquired in-house with a J720 spectropolarimeter (Jasco Corp., Japan) using a bandwidth of 1 nm and a response time of 1 s. Data collection was performed at room temperature, with a scanning speed of 100 nm/min. Nine scans were obtained for each sample, and all spectra were corrected by subtracting buffer blanks.

2.6. Intrinsic fluorescence.

The relative intrinsic fluorescence intensities of sPLA2 and sPLA2:Q were monitored with a Varian Cary Eclipse. The proteins were solubilized in water at room temperature. The measurements were performed in a 1.5-mL 1-cm path length quartz cuvette. Fluorescence was measured between 300 and 450 nm after excitation at 280 nm.

2.7. Mass spectrometry

The molecular mass of sPLA2 and sPLA2:Q were determined by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry using a Voyager-DE PRO MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems). One microliter of samples (sPLA2 and sPLA2:Q) in 0.1% TFA was mixed with 2 μ L of the matrix α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, 50% acetonitrile, and 0.1% TFA (v/v). The matrix was prepared with 30% acetonitrile and 0.1% TFA (v/v). Ion masses were determined with an acceleration voltage of 25 kV, the laser operated at 2890 μ J/cm², a 300-ns delay, and the linear analysis mode.

2.8. Measurement of sPLA2 activity

sPLA2 activity was measured following the protocol described by Lee et al. [17] and modified by Toyama et al. [14] in 96-well plates, using 4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid (4N3OBA, BIOMOL, USA) as substrate. Enzyme activity, expressed as the initial velocity of the reaction (V_0), was calculated based on the increase in absorbance after 20 min. All assays were performed with absorbance at 425 nm using a SpectraMax 340 multiwell plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). After the addition of native or treated sPLA2 (20 μ g), the reaction mixture was incubated for up to 40 min at 37 °C and the absorbance read at 5-min intervals.

2.9. Antibacterial activity

The antibacterial activity was assayed as described by Santi-Gadelha et al. [18] and the structural modification was done following the method of Toyama et al. [19]. *Clavibacter michiganensis michiganensis* cells were harvested from fresh agar plates and suspended in sterile distilled water ($A_{600\text{ nm}} = 3 \times 10^8$ CFU/mL). Aliquots of bacterial suspension were diluted to 10^3 colony-forming units/mL (CFU/mL) and incubated with sPLA2 or sPLA2:Q samples (75 µg/mL) for 60 min at 28 °C. Survival was assayed on nutrient agar (Difco) plates ($n=5$). For both antibacterial assays, electron microscopy assessments of morphologic alterations were performed in the presence of saline (negative control), quercetin (100 µM, quercetin control), sPLA2, and sPLA2:Q.

2.10. Paw edema assay

Paw edema assays were performed with the aim of evaluate the inflammatory activity induced by sPLA2. For this assay female Swiss mice were used, since they show a lower aggressive behavior than male mice. Paw edema was induced by a single subplantar injection of 25 µL sPLA2 or sPLA2:Q (25 µg/paw). Paw volume was measured immediately before the injection and at selected time intervals thereafter (30, 60, 120, 180, and 360 min) using a hydroplethysmometer (model 7150, Ugo Basile, Italy). All samples were dissolved in sterile saline solution (0.9%). Results were expressed as the increase in paw volume (µL) and calculated by subtracting the basal volume from the volume following treatment.

2.11. Neurotoxic effect assay

Male chicks (4–8 days old) were killed with ether, and the biventer cervicis muscle was removed [20] and mounted under a resting tension of 1 g in a 4 mL organ bath containing aerated (95% O₂ + 5% CO₂) Krebs solution (118.7 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.88 mM CaCl₂, 1.17 mM KH₂PO₄, 1.17 mM MgSO₄, 25.0 mM NaHCO₂ and 11.65 mM glucose, pH 7.5) at 37 °C. A bipolar platinum ring electrode was placed around the tendon, which ran the length of the nerve trunk supplying the muscle. Indirect stimulation was applied with a Grass S4 stimulator (0.1 Hz, 0.2 ms, 3–4 mV). Muscle contractions and contractures were recorded by connecting the preparation to a force displacement transducer (Narco Biosystems Inc.) coupled to a Gould RS 3400 recorder. Contractures to exogenous acetylcholine (ACh, 55 or 110 µM for 60 s) and KCl (5 mM for 120–130 s) were obtained in the absence of nerve stimulation prior to the addition of sPLA2 or sPLA2:Q (10 µg/mL) and at the end of the experiment. The preparations were allowed to stabilize for at least 20 min before the addition of ACh, KCl, or a single concentration (10 µg/mL) of the compounds.

2.12. Platelet aggregation studies

Platelet aggregation activities were assayed as described by Toyama et al. [19]. Briefly, venous blood was collected with informed consent from healthy volunteers who denied taking any medication in the previous 14 days. Collected blood was immediately transferred into polypropylene tubes containing one-tenth of final volume of acid citrate dextrose (ACD-C; citric acid 3%, trisodium citrate 4%, glucose 2%; 1:9 v/v). Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifuging whole blood at $200 \times g$ for 15 min. PRP was washed in a wash buffer solution (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, sodium citrate 12 mM, glucose 10 mM and saccharose 12 mM; pH 6; 5:7 v/v) and centrifuged at $800 \times g$ for 12 min at 20 °C. The platelet pellet was gently resuspended in Krebs–Ringer solution and counts were performed on a Neubauer chamber. The final platelet suspension was adjusted to 1.2×10^8 platelets/mL. Platelet

aggregation was carried out using 400 µL of the washed platelet solution in a cuvette and incubated at 37 °C with constant stirring. The desired concentration of protein was added 3 min prior to the addition of a platelet aggregation inducer (thrombin). Aggregation was subsequently recorded for 5–10 min with an aggregometer (Chrono-log Lumi-Aggregometer model 560-Ca, Havertown, PA, USA). Aggregation experiments were performed with a concentration of 15 µg/mL of sPLA2 and sPLA2:Q.

2.13. Myotoxic activity

The liberation of creatine kinase (CK) from damaged muscle cells was followed by use of the CK-NAC kit (Laborlab) to measure the enzyme activity in mice plasma. Five groups of animals (18–22 g) were injected in the right gastrocnemius muscle with 25 µL of 1.0 mg/mL of sPLA2, sPLA2:Q, or quercetin ($n=4$) while the control group received an equal volume of 0.15 M NaCl. Blood was collected from the tail after 1 h into tubes containing heparin. The amount of CK was determined using 4 µL plasma, which was incubated for 3 min at 37 °C with 1.0 mL of the reagent according to the kit protocol. Activity was expressed in units per liter (U/L).

2.14. Molecular modeling (docking)

The structural optimization of the quercetin ligand was initially achieved using the quantum chemical AM1 method [21] implemented in the BioMedCache program (BioMedCache, 1989) with default values for the convergence criteria. Docking calculations were performed with the GOLD 4.0 program [22] to obtain the *in silico* affinity of quercetin to the Crotoxin B target, a basic sPLA2 from *C. durissus terrificus* venom. This sPLA2 structure was taken from the RCSB Protein Data Bank [PDB] under the PDB code 2QOG. The structure of the B chain was chosen for calculations, maintaining the Ca²⁺ ion and the water molecule number 188, located 3.16 Å from Ca²⁺.

Docking calculations were performed to consider the flexibility of the quercetin ligand in such a way that torsions were considered active during the calculation. The active site was defined as all atoms within a 10-Å radius from His48, an important residue according to the literature [23,24].

2.15. Statistical analyses

Results were reported as means $\pm$ SEM of replicate experiments. The significance of differences between means was assessed by an analysis of variance, followed by a Dunnett's test when several experimental groups were compared to the control group. The confidence limit for significance was 5%.

3. Results

3.1. Purification of sPLA2 and Incubation of sPLA2 with quercetin

sPLA2 was isolated from *C. durissus terrificus* venom through reverse-phase chromatography (Fig. 1a) and its enzymatic activity was evaluated using 4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid (4N3OBA) as a substrate. SDS-PAGE revealed the presence of one protein band with a molecular mass of 14 kDa (Fig. 1c), corresponding to sPLA2. After incubation with quercetin, sPLA2:Q (sPLA2 + quercetin) eluted at 23.7 min whereas sPLA2 had a retention time of 24.3 min (Fig. 1b). This difference indicates an interaction between sPLA2 and quercetin, which changed the hydrophobicity of sPLA2.

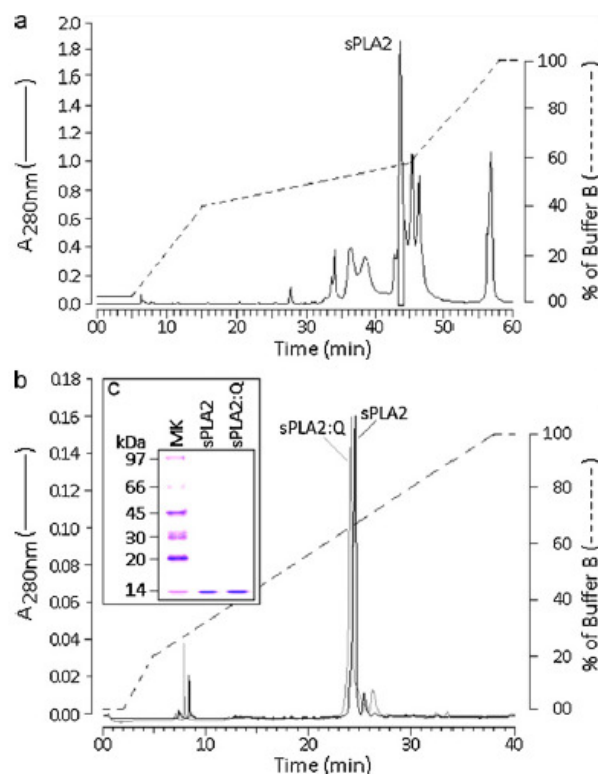


Fig. 1. Purification and chemical modification of secretory phospholipase A2 (sPLA2). (a) Fractionation of whole venom was performed by reverse-phase HPLC (C5 column 0.10 cm × 25 cm) using a non-linear concentration gradient of buffer to obtain a high purity protein. (b) Reverse phase HPLC profile of sPLA2 before and after modification with quercetin. (c) Tricine SDS-PAGE of sPLA2 from *Crotalus durissus terrificus*.

3.2. Circular dichroism spectroscopy

The effect of quercetin on the sPLA2 structure was evaluated by absorption spectra of sPLA2 and sPLA2:Q, circular dichroism, and fluorescence spectroscopy. As shown in Fig. 2a, few modifications were observed in the 270–280 nm wavelength region. However, some changes were observed on CD and fluorescence spectra after treatment with quercetin. CD spectra analysis showed modifications mainly in the region corresponding to the α -helices, suggesting that quercetin is able to induce changes in the secondary structure of this enzyme (Fig. 2b).

3.3. Intrinsic fluorescence

The presence of aromatic amino acids such as tryptophan and tyrosine in the protein chain allows the use of fluorescence spectra, which is sensitive for the investigation of protein conformation and ligand binding. Fig. 3a shows an increase in the intensity of fluorescence emission spectra after treatment with quercetin, suggesting that this flavonoid is able to change the structure of the protein at the tertiary structure level, however, fluorescence spectrum of quercetin has shown that this compound has a peak of fluorescence near the region of the tryptophan and possibly contributes to increase the fluorescence observed.

3.4. Mass spectrometry

Mass spectrometry by MALDI-TOF indicated that the exact molecular mass of the native protein is 14,425.56 Da while that

of sPLA2:Q is 14,727.79 (Fig. 3b), an increase of 302.23 Da in sPLA2 treated with quercetin, suggesting that one molecule of quercetin is bound to the protein structure.

3.5. Measurement of sPLA2 activity and antibacterial activity

The effect of quercetin on sPLA2 enzymatic activity was evaluated. Both enzymes, sPLA2 and sPLA2:Q exhibit allosteric behavior (Fig. 4a), and quercetin strongly inhibits sPLA2 activity. The maximum velocity after 20 min for sPLA2 was 0.330 ± 0.04 vo/mol whereas for sPLA2:Q was 0.196 ± 0.02 vo/mol, showing a significant decrease of 40%. To analyze possible correlations between the enzymatic activity of sPLA2 and its antibacterial activity, bacterial viability was tested by CFU counting. The assay was performed using *C. michiganensis michiganensis* (Gram-positive). As shown in Fig. 4b, sPLA2 has a higher inhibitory potential on bacterial growth than sPLA2:Q, since sPLA2 decreased CFU levels to 9.8% (90.2% inhibition) compared to 63.5% (only 36.5% inhibition) for sPLA2:Q.

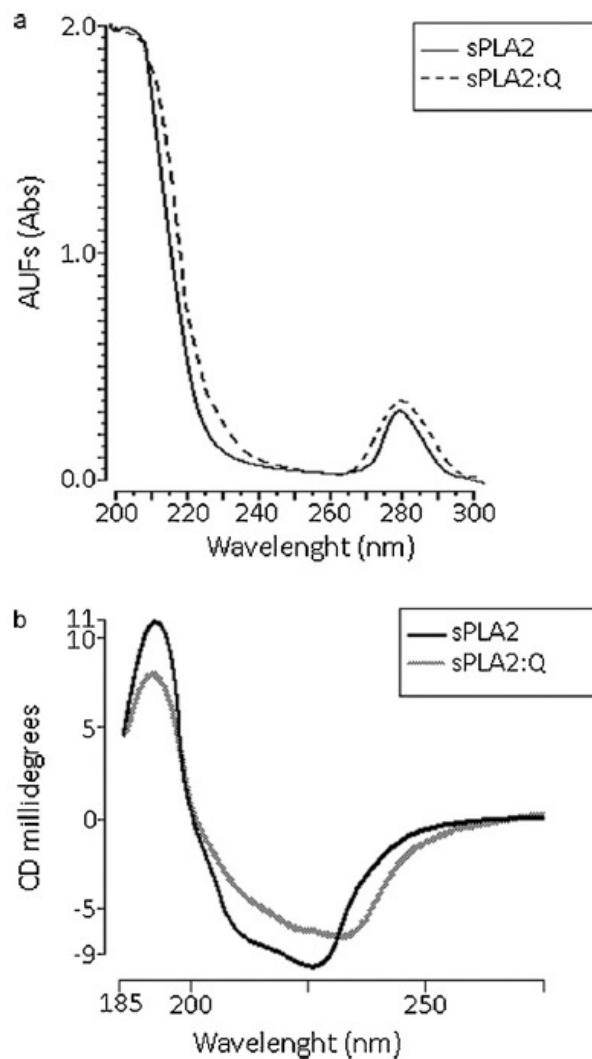


Fig. 2. UV/vis absorption and circular dichroism (CD) spectra. (a) Absorption spectrum of sPLA2 and sPLA2 after treatment with quercetin (sPLA2:Q) at wavelength intervals 200–300 nm. The proteins were analyzed at 280 nm. (b) CD spectra of native sPLA2 and sPLA2:Q. Data over the range 185–280 nm are shown. The CD spectra are expressed in theta machine units in millidegrees.

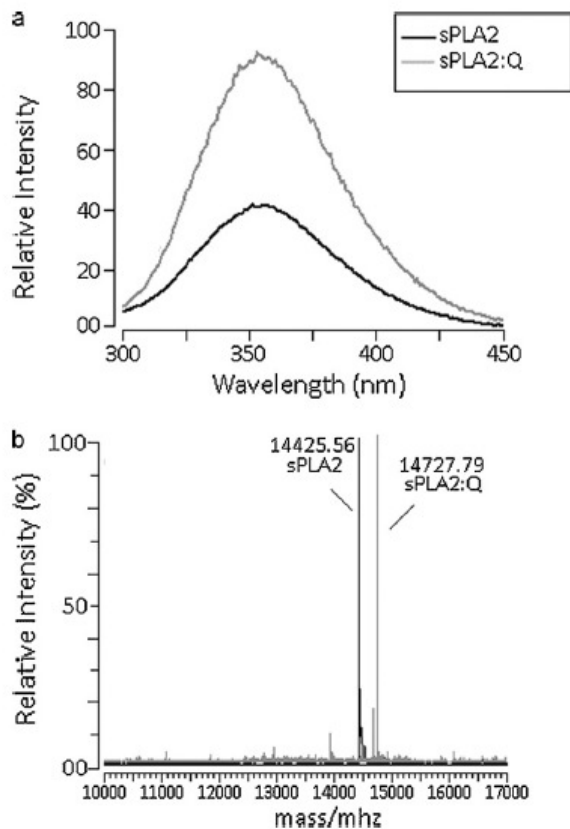


Fig. 3. Intrinsic fluorescence and mass spectrometry. (a) Intrinsic fluorescence of native sPLA2 and sPLA2:Q was measured with excitation at 280 nm and emission monitoring between 300 and 450 nm. (b) MALDI-TOF mass spectrometry analysis of native sPLA2 and sPLA2:Q shows a difference between the molecular masses corresponding to one molecule of bound quercetin.

3.6. Paw edema assay

Since flavonoids have shown a good capacity to inhibit sPLA2 and consequently decrease its pro-inflammatory activity [13,25], the effect of quercetin on sPLA2 was evaluated. Following subplantar injections on Swiss mice, sPLA2 had a huge potential to induce edema after 60 min (Fig. 5a). Under the same experimental conditions, sPLA2:Q did not show a decrease in edema effect, but the maximum edema was observed after 30 min.

3.7. Neurotoxic effect assay

When the neurotoxic activity was evaluated, both sPLA2 and sPLA2:Q induced neuromuscular blockage, but sPLA2 induced a faster effect at 80 min, whereas sPLA2:Q had a similar behavior at 100 min (Fig. 5b), suggesting that quercetin changed the velocity of native sPLA2 binding to the neurotoxic site of chick biventer muscle. However, this change is not able to abolish the neurotoxic effect of sPLA2.

3.8. Platelet aggregation studies

In order to evaluate the anti-coagulant potential induced by sPLA2 were performed platelet aggregation assays. The results have shown that sPLA2 from *C. durissus terrificus* has a moderate ability to cause aggregation of washed platelets. While sPLA2 from *C. durissus cascavella* induces about 85% aggregation at 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

[26], sPLA2 from *C. durissus terrificus* induced 70% aggregation at a concentration of 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Treatment with quercetin decrease this effect, with 32% aggregation induced by sPLA2:Q at the same concentration (Fig. 5c).

3.9. Myotoxic activity

The ability of sPLA2 to cause myonecrosis was also evaluated through measurement of released creatine kinase. Fig. 5d shows that sPLA2 induces an increase in plasma creatine kinase levels of $821.39 \pm 107.8 \text{ U/L}$, indicating its ability to cause muscle damage. Treatment with quercetin significantly decreased the creatine kinase levels measured to $492.28 \pm 71.5 \text{ U/L}$, a 40% decrease.

3.10. Molecular modeling (docking)

In order to analyze possible intermolecular interactions between sPLA2 and quercetin, we performed *in silico* studies using molecular modeling (docking). The best docking solution for the quercetin ligand is shown in Fig. 6a. The GOLD score for this result was 43.94, showing good affinity for the target. The presence of several important intermolecular interactions such as (i) hydrogen bonds with residues Cys45 and His48 at 2.69 and 3.00 Å, respectively; (ii) hydrogen bond with water molecule 188 at 3.16 Å; (iii) one polar contact with Ca^{2+} ion at 3.19 Å; and (iv) hydrophobic interactions with residue Phe5 can account for the stability of the quercetin-sPLA2 complex (Fig. 6a and b).

4. Discussion and conclusions

In this study, sPLA2 from *C. durissus terrificus* was modified by quercetin, a flavonoid known for its anti-inflammatory activ-

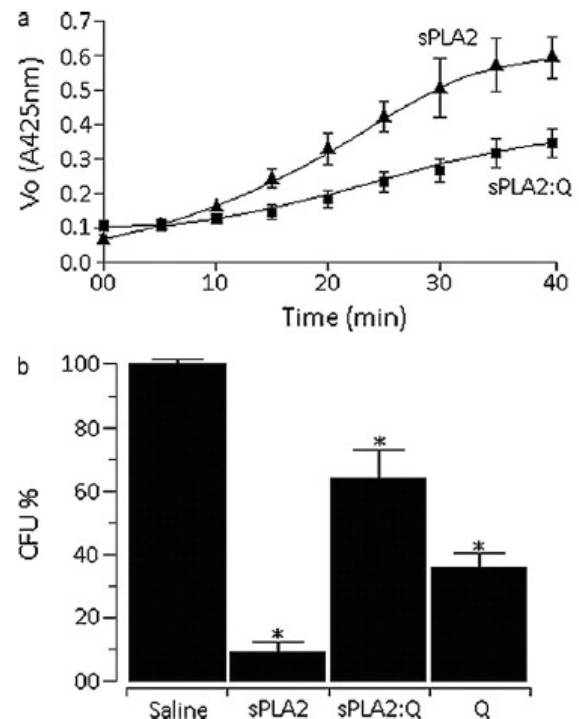


Fig. 4. Enzymatic and antibacterial assays. (a) Enzymatic activity was analyzed using 4N3OBA as substrate and monitored at wavelength 425 nm. sPLA2:Q shows a significant decrease compared to native sPLA2. (b) Effect of native sPLA2 and sPLA2:Q against Gram-positive bacteria. Quercetin decreases the ability of sPLA2 to inhibit Gram-positive bacteria. Error bars indicate SEM * $P < 0.05$ compared to saline control.

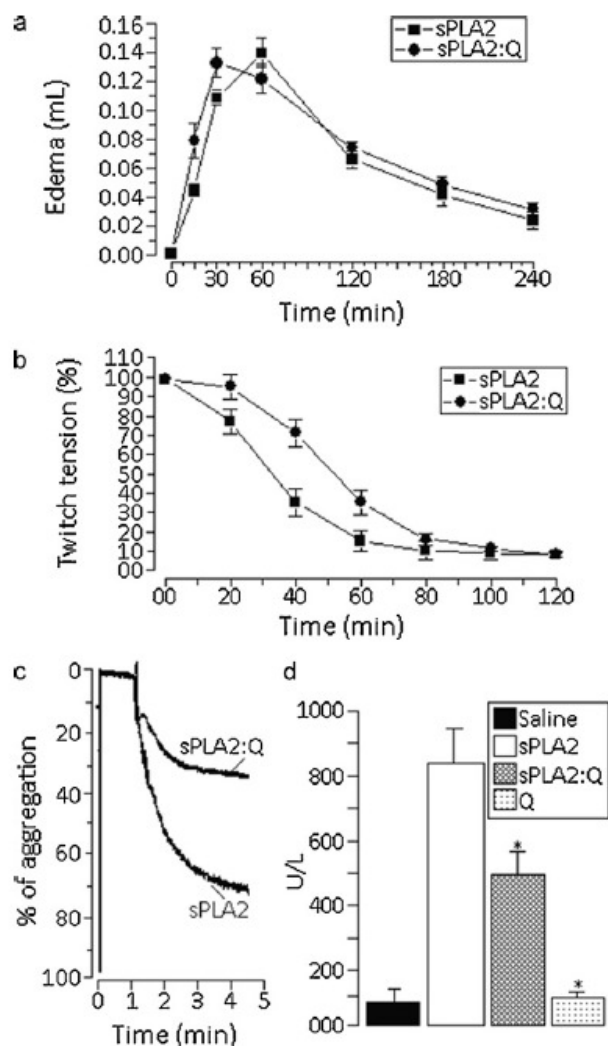


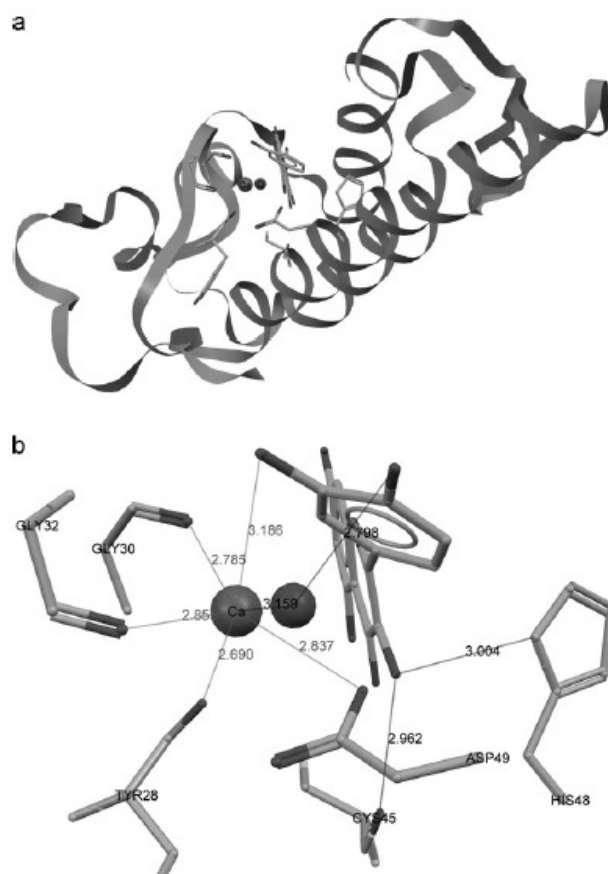
Fig. 5. Pharmacological assays. (a) Paw edema induced after the injection of sPLA2 and sPLA2:Q (25 µg/paw) into the right paw of Swiss mice. Measurements were done after 30, 60, 120, 180 and 240 min, with no differences observed after treatment with quercetin. (b) Neurotoxic effect of sPLA2 and sPLA2:Q on chick biventer cervicis muscle. Results were expressed as the percentage change in twitch tension. (c) Percent platelet aggregation caused by native sPLA2 and sPLA2:Q. The washed platelets assay was performed with venous blood collected from healthy volunteers and the concentration of both proteins was 15 µg/mL. (d) Myonecrosis was assayed based on the creatine kinase levels in Swiss mice. Twenty-five micrograms of native sPLA2, sPLA2:Q, and pure quercetin were injected into the gastrocnemius muscle. Results were expressed as units of enzymatic activity per liter (U/L). Error bars indicate the SEM. * $P < 0.05$ compared to sPLA2 activity.

ities. Treatment with quercetin resulted in modification of the protein secondary structure as observed in circular dichroism assay (Fig. 2b). Similar results were observed by Iglesias et al. [12] with sPLA2 from *C. durissus cascavella* after modification with the flavonoid morin. Although a secondary structure modification could be observed, the results do not allow concluding about tertiary structure modification, once the fluorescence spectrum of quercetin has shown that this compound has a fluorescent peak near the region of the tryptophan, suggesting that the increase in the total fluorescence of the protein might be caused due to the bonding of quercetin.

Treatment with quercetin led to a decrease of about 40% in sPLA2 enzymatic activity, similar to p-bromophenacyl bromide (p-BPB), a PLA2 inhibitor. Docking studies suggest that quercetin binds in

the vicinity of the His48 residue, leading to inhibition of enzymatic activity. As shown by Verheij et al. [23], and Scott and Sigler [24], these amino acids are fundamental to enzymatic activity; His48 is involved in the first step of the enzymatic mechanism, and Asp49 is important for binding to Ca^{2+} , a cofactor. It seems that quercetin bound to sPLA2 interferes with the binding between the protein and its substrate. Soares et al. [27] suggested that enzymatic activity is not required for antibacterial activity after chemical modification with BPB and EDTA in a *C. durissus terrificus* sPLA2 isoform, and the same was observed by Diz Filho et al. [28] for *Crotalus durissus ruruima*. However, our results show correlation between the enzymatic and antibacterial activities against Gram-positive bacteria. Treatment of sPLA2 with quercetin decreased both these activities. According to Buckland and Wilton [29], mammalian PLA2 phospholipid hydrolysis is correlated with antibacterial activity because both are calcium dependent. We believe this isoform behaves as a mammalian PLA2 in this respect.

Several studies have investigated the anti-inflammatory effects of flavonoids as well as their effect on both catalytic and pharmacological activities of PLA2 [8,11,12,30,31]. According to these models, quercetin molecules would interact with the enzymatic site thus affecting enzymatic and pharmacological activities. Our results have showed that some pharmacological activities such as inflammatory and neurotoxicity were not inhibited after treatment with quercetin. This result corroborates the proposal by Ohno et al. [32], who suggested the existence of a distinct pharmacological site



near the C-terminal region of PLA2 away from the catalytic site. After modifications with 7-hydroxycoumarin, Toyama et al. [31] observed that decreasing the enzymatic activity had not suppressed the pharmacological effect of PLA2, suggesting the presence of a distinct site. Although the inflammatory and neurotoxic effects were unchanged after treatment with quercetin, the myotoxic and platelet aggregation effects were decreased by 40% and 55%, respectively, indicating dependency on the enzymatic activity. We believe that perhaps both the myotoxic and the platelet aggregation sites are located in a second pharmacological site near the calcium binding loop as proposed by Valentin and Lambeau [33]. Thus, after binding to the protein near that region, quercetin affects this site more directly leading to considerable changes in these activities.

Molecular docking has been used during the last decades due to its importance in elucidating, through computational approaches, the best matches for protein–ligand interactions [34]. In this study, molecular docking was an important tool in evaluating the interactions between sPLA2 and quercetin. Our result agrees with that observed by mass spectrometry, showing that one molecule of quercetin is binding to the protein. Additionally, molecular docking was useful in elucidating some important interactions between sPLA2 and quercetin, which allowed better understanding of the molecular reasons for the effects of quercetin as well as other structurally similar flavonoids that could be studied in the future.

The results shown here led us to conclude that quercetin binding to the protein decreased the catalytic activity of sPLA2 from *C. durissus terrificus*. This sPLA2 probably has two distinct pharmacological sites: one responsible for effects such as platelet aggregation, myotoxicity, and antibacterial activities; and another responsible for inflammatory and neurotoxic effects. We believe the first one is located near the calcium-binding loop region and consequently near the catalytic site where quercetin binds to the protein, thus leading to a loss of activities dependent on this site. The second one, we believe is located near C-terminal region, away from where quercetin binds, and is not directly or indirectly affected by the quercetin binding to the catalytic site. Other flavonoids with very similar chemical structures have a potential to interact with sPLA2 from serpents. Further docking studies with new molecules of this class could be useful in predicting how potent these compounds could be as sPLA2 inhibitors. Although our study clarifies some aspects of the chemical and pharmacological interactions between a flavonoid and a sPLA2, further studies are necessary to better understand the action of flavonoids on sPLA2 activities.

Conflict of interest statement

The authors have no conflict of interest to disclose.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Proc. No: 133151/2009-3, Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support.

References

- [1] R. Kini, Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes, *Toxicon* 42 (8) (2003) 827–840.
- [2] T. Nevalainen, G. Graham, K. Scott, Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review, *Biochim. Biophys. Acta* 1781 (1–2) (2008) 1–9.
- [3] J. Burke, E. Dennis, Phospholipase A2 biochemistry, *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23 (1) (2009) 49–59.
- [4] J. Evangelista, A. Martins, N. Nascimento, C. Sousa, R. Alves, D. Toyama, M. Toyama, J. Evangelista, D. Menezes, M. Fonteles, M. Moraes, H. Monteiro, Renal and vascular effects of the natriuretic peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom, *Toxicon* 52 (7) (2008) 737–744.
- [5] A. Soares, J. Giglio, Chemical modifications of phospholipases A2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties, *Toxicon* 42 (8) (2003) 855–868.
- [6] R. Kini, Y. Chan, Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A2 enzymes, *J. Mol. Evol.* 48 (2) (1999) 125–132.
- [7] S. Chakraborti, Phospholipase A(2) isoforms: a perspective, *Cell Signal.* 15 (7) (2003) 637–665.
- [8] J. Lättig, M. Böhl, P. Fischer, S. Tischer, C. Tietböhl, M. Menschikowski, H. Gutzeit, P. Metz, M. Pisabarro, Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A2 by flavonoids: rationale for lead design, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 21 (8) (2007) 473–483.
- [9] G. Di Carlo, N. Mascolo, A. Izzo, F. Capasso, Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sci.* 65 (4) (1999) 337–353.
- [10] B. Gil, M. Sanz, M. Terencio, R. Gunasegaran, M. Paya, M. Alcaraz, Morelloflavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholipase A(2) with anti-inflammatory activity, *Biochem. Pharmacol.* 53 (1997) 733.
- [11] M. Lindahl, C. Tagesson, Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2, *Inflammation* 21 (3) (1997) 347–356.
- [12] C. Iglesias, R. Aparicio, L. Rodrigues-Simioni, E. Camargo, E. Antunes, S. Marangoni, D. de Oliveira Toyama, L. Beriam, H. Monteiro, M. Toyama, Effects of morin on snake venom phospholipase A2 (PLA2), *Toxicon* 46 (7) (2005) 751–758.
- [13] M. Lindahl, C. Tagesson, Selective inhibition of group II phospholipase A2 by quercetin, *Inflammation* 17 (5) (1993) 573–582.
- [14] M. Toyama, D. de Oliveira, L. Beriam, J. Novello, L. Rodrigues-Simioni, S. Marangoni, Structural, enzymatic and biological properties of new PLA(2) isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom, *Toxicon* 41 (8) (2003) 1033–1038.
- [15] H. Zhao, L. Tang, X. Wang, Y. Zhou, Z. Lin, Structure of a snake venom phospholipase A2 modified by p-bromo-phenacyl-bromide, *Toxicon* 36 (6) (1998) 875–886.
- [16] U. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (5259) (1970) 680–685.
- [17] W. Lee, M. Toyama, A. Soares, J. Giglio, S. Marangoni, I. Polikarpov, Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of piratoxin III, a D-49 phospholipase A2 from the venom of *Bothrops pirajai*, *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* 55 (Pt. 6) (1999) 1229–1230.
- [18] T. Santi-Gadelha, B. Rocha, C. Oliveira, K. Aragão, E. Marinho, C. Gadelha, M. Toyama, V. Pinto, C. Nagano, P. Delatorre, J. Martins, F. Galvani, A. Sampaio, H. Debray, B. Cavada, Purification of a PHA-like chitin-binding protein from *Acacia farnesiana* seeds: a time-dependent oligomerization protein, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 150 (1) (2008) 97–111.
- [19] M. Toyama, D.O. Toyama, L. Passero, M. Laurenti, C. Corbett, T. Tomokane, F. Fonseca, E. Antunes, P. Joazeiro, L. Beriam, M. Martins, H. Monteiro, M. Fonteles, Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom, *Toxicon* 47 (1) (2006) 47–57.
- [20] B. Ginsborg, J. Warriner, The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation, *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 15 (1960) 410–411.
- [21] M.J.S. Dewar, E.G. Zebisch, E.F. Healy, J.J.P. Stewart, Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (13) (1985) 8.
- [22] G. Jones, P. Willett, R. Glen, A. Leach, R. Taylor, Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking, *J. Mol. Biol.* 267 (3) (1997) 727–748.
- [23] H. Verheij, J. Volwerk, E. Jansen, W. Puyk, B. Dijkstra, J. Drenth, G. de Haas, Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A2. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism, *Biochemistry* 19 (4) (1980) 743–750.
- [24] D. Scott, P. Sigler, Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A2, *Adv. Protein Chem.* 45 (1994) 53–88.
- [25] B. Gil, M. Sanz, M. Terencio, M. Ferrández, G. Bustos, M. Payá, R. Gunasegaran, M. Alcaraz, Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipases A2 and inflammatory responses in mice, *Life Sci.* 54 (20) (1994) PL333–338.
- [26] F. Fonseca, E. Antunes, R. Morganti, H. Monteiro, A. Martins, D. Toyama, S. Marangoni, M. Toyama, Characterization of a new platelet aggregating factor from crotoxin *Crotalus durissus cascavella* venom, *Protein J.* 25 (3) (2006) 183–192.
- [27] A. Soares, A. Mancin, A. Cecchini, E. Arantes, S. França, J. Gutiérrez, J. Giglio, Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A(2) subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33 (9) (2001) 877–888.
- [28] E. Diz Filho, S. Marangoni, D. Toyama, F. Fagundes, S. Oliveira, F. Fonseca, A. Calgarotto, P. Joazeiro, M. Toyama, Enzymatic and structural characterization of new PLA2 isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*, *Toxicon* 53 (1) (2009) 104–114.
- [29] A. Buckland, D. Wilton, The antibacterial properties of secreted phospholipases A(2), *Biochim. Biophys. Acta* 1488 (1–2) (2000) 71–82.
- [30] H. Kim, H. Pham, V. Ziboh, Flavonoids differentially inhibit guinea pig epidermal cytosolic phospholipase A2, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 65 (5–6) (2001) 281–286.
- [31] D. Toyama, S. Marangoni, E. Diz-Filho, S. Oliveira, M. Toyama, Effect of umbelliferone (7-hydroxycoumarin, 7-HOC) on the enzymatic, edemato-

- genic and necrotic activities of secretory phospholipase A2 (sPLA2) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom, *Toxicon* 53 (4) (2009) 417–426.
- [32] M. Ohno, T. Chijiwa, N. Oda-Ueda, T. Ogawa, S. Hattori, Molecular evolution of myotoxic phospholipases A2 from snake venom, *Toxicon* 42 (8) (2003) 841–854.
- [33] E. Valentin, G. Lambeau, Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1488 (1–2) (2000) 59–70.
- [34] I. Halperin, B. Ma, H. Wolfson, R. Nussinov, Principles of docking: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions, *Proteins* 47 (4) (2002) 409–443.

Article

Modulation of the Pharmacological Activities of Secretory Phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* Induced by Naringin

Marcelo L. Santos ¹, Daniela O. Toyama ², Simone C. B. Oliveira ³, Camila A. Cotrim ³, Eduardo B. S. Diz-Filho ³, Fábio H. R. Fagundes ³, Veronica C. G. Soares ³, Ricardo Aparicio ¹ and Marcos H. Toyama ^{4,*}

¹ Laboratório de Biologia Estrutural e Cristalografia, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

² Universidade Presbiteriana Mackenzie, CCBS, São Paulo, Brazil

³ Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

⁴ Laboratório de Macromoléculas Química, UNESP/CLP, São Vicente, São Paulo, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: mhtjpn@yahoo.com; Tel.: +55 13 3469-7682; Fax: + 55 13 3469-7374.

Received: 10 December 2010; in revised form: 4 January 2011 / Accepted: 13 January 2011 /

Published: 18 January 2011

Abstract: In this work we have characterized the action of the naringin, a flavonoid found in grapefruit and known for its various pharmacological effects, which include antioxidant, blood lipid lowering and anticancer activity, on the structure and biochemical activities of a secretory phospholipase A (sPLA2) from *Crotalus durissus cascavella*, an important protein involved in the releasing of arachidonic acid in phospholipid membranes. sPLA2 was incubated with naringin (mol:mol) at 37 °C and a discrete reduction in the UV scanning signal and a modification of the circular dichroism spectra were observed after treatment with naringin, suggesting modifications of the secondary structure of the protein. This flavonoid was able to decrease enzymatic activity and some pharmacological effects, such as myonecrosis, platelet aggregation, and neurotoxic activity caused by sPLA2, however, the inflammatory effect was not affected by naringin. In addition, small angle X-ray scattering (SAXS) data were collected for sPLA2 and naringin-treated sPLA2 to evaluate possible modifications of the protein structure. These structural investigations have shown that sPLA2 is an elongated dimer in solution and after treatment with naringin a conformational change in the dimeric configuration was observed. Our results suggest

that structural modification may be correlated with the loss of enzymatic activity and alterations in pharmacological properties.

Keywords: secretory phospholipase A2; *Crotalus durissus cascavella*; naringin; enzymatic activity pharmacological effects; small angle X-ray scattering

1. Introduction

Polyphenolic compounds, such as flavonoids and coumarins, are widely distributed in the plant kingdom. Some of these compounds have interesting medicinal properties, exerting anti-lipoperoxidant, anti-inflammatory, anti-allergic, antiviral, antibacterial, and anticancer effects [1]. Recent studies have shown that flavonoids from various plants induce an *in vitro* dose-dependent inhibition of phospholipid hydrolysis mediated by both secretory and cytosolic phospholipases A2 (sPLA2 and cPLA2, respectively) [2,3]. Flavonoids assayed *in vivo* have also shown a significant anti-inflammatory effect against acute edema induced by carrageenan [4].

It has been shown that flavonoids inhibit group I sPLA2s from porcine pancreas and *Naja naja* in a different way from group II sPLA2 from *Vipera russelii* and *Crotalus atrox*. The most important regions involved in the inhibition of sPLA2 were reported to be hydroxyl groups in the 30- and 40-positions [5,6]. In addition, Iglesias *et al.* [7] showed that flavonoids such as morin modify the secondary structure of snake venom sPLA2 similarly to sPLA2 when modified with 7-hydroxy coumarin [8]. Group II sPLA2 enzymes have been found at inflammatory sites in animal models, as well as in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and various human inflammatory diseases in which a correlation between serum sPLA2 levels and disease activity is observed [9,10]. Moreover, exogenous administration of sPLA2, such as snake venom sPLA2, induces or exacerbates the inflammatory response in animals [11,12]. Structural analyses have revealed that snake venom sPLA2s have a similar molecular profile as human secretory PLA2s as well as a conserved catalytic site [13].

Naringin, hesperidin, and neohesperidin have been described as some of the most abundant flavanones found in the *Citrus* genus, and are responsible for many of the pharmacological properties of *Citrus* flavonoids. These flavanones are particularly interesting because of their antitumoral and anti-inflammatory effects, which are linked to the abilities of these compounds to inhibit enzymes involved in cell activation [14]. Because sPLA2 from snake venom has been characterized as a pro-inflammatory inducer, we investigated for the first time the effect of naringin on the edematogenic activity of sPLA2 from *Crotalus durissus cascavella* venom and evaluated other biological and pharmacological activities induced by this protein.

In addition, we also investigated the structural modification induced by this polyphenolic compound on the structure of sPLA2. Like other flavonoids, naringin displays a combination of multiple hydroxyl groups substituting a ketone-containing flavonoid skeleton and a glycoside group [15]. Reports on flavonoid structure–function relationships have demonstrated that antioxidant activities and enzyme inhibition are dependent on particular flavonoid structural motifs, such as structure oxidation levels, substituents (position, number, and nature of groups), and the presence of glycosylation [14]. Phenolics

compounds, particularly flavonoids, have been shown to possess important antioxidant activity toward free radicals, which are associated with the natural metabolism of aerobic cells [16].

To obtain structural information from native sPLA2 and sPLA2 after naringin treatment (sPLA2-Nar), we used a variety of solution-based techniques. Because small angle X-ray scattering (SAXS) is a sensitive technique for analyzing global shape and dimensions of macromolecules in solution [17], we employed this method together with molecular modeling, circular dichroism, and bioinformatic analysis.

Several sPLA2 crystallographic studies have been reported describing the main structural features of this class of proteins [18] and the correlations with biochemical properties [19]. However, only a few reports have been published regarding SAXS analysis of PLA2 [20,21]. In these studies, two different oligomeric states were observed for sPLA2s in solution: monomeric for sPLA2 from *Cerrophidion godmani* [20] and dimeric for sPLA2 from *Bothrops jararacussu* [21].

In addition, electrophoresis and spectroscopic studies have suggested that the dimer-like structure in solution is common to sPLA2s from other snake venoms [22,23]. Two main different conformations were reported using crystallographic models for these dimers: an extended conformation maintained by polar interactions formed between the N-terminal helix regions and β -wing residues of each monomer, and a compact dimeric organization of the molecules in which the hydrophobic channels are buried [24,25]. In solution, however, only the compact conformation has been observed [21]. In this paper, we describe a new extended dimer configuration for PLA2 in solution. The low resolution model obtained for sPLA2-Nar presents an interesting bending in comparison with the envelopes for the native sPLA2 that seem to be correlated with the enzymatic and pharmacological alterations observed in our studies.

2. Results and Discussion

Chemical treatment of purified sPLA2 with naringin was conducted as described by Iglesias *et al.* [7]. Under these conditions, a discrete decrease in the absorbance of sPLA2-Nar in the wavelength region between 270–285 nm (Figure 1a) was observed, which can be attributed to the spectroscopic absorption of the aromatic amino acid residues. Amino acid analysis indicated that naringin mainly induced modification on the aromatic amino acid residues and histidines, similar to what was reported in a previous study with morin [7]. However, we observed slight changes in serine composition (Figure 1b).

The enzymatic activity of native sPLA2 was virtually abolished by treatment with naringin, which showed similar inhibition with p-BPB (Figure 2a; $n = 12$ experiments; $p < 0.05$). Native sPLA2 induced a moderate myotoxic effect (Figure 2b). Previous treatment of sPLA2 with naringin reduced the myotoxic effect induced by sPLA2 2-fold, whereas *p*-bromophenacyl bromide (p-BPB) abolished this effect (Figure 2b; $n = 6$ experiments; $P < 0.05$). Native sPLA2 induced irreversible neuromuscular blockage 70 minutes after injection of the toxin into chick *biventer cervicis* muscle (Figure 2c), whereas sPLA2 treated with naringin induced a moderate blockage when compared to native sPLA2. Although both naringin and p-BPB virtually abolished the enzymatic activity of sPLA2, only p-BPB treatment irreversibly abolished the neurotoxic effect induced by sPLA2 (Figure 2c; $n = 6$ experiments). Platelet aggregation induced by native sPLA2 was strongly reduced by treatment with naringin and was abolished by treatment with p-BPB (Figure 2d, $n = 4$ experiments for each drug).

Subplantar injections of treated and non-treated sPLA2 (5 µg/paw; n = 5) induced significant acute edema ($p < 0.05$) when compared to the control (PBS) (Figure 3a). Naringin treatment induced a slight decrease in edema volume in comparison to native sPLA2, whereas p-BPB strongly reduced the effect. On the other hand, previous injection of naringin into the paw affected the edema formation. In this new assay, sPLA2-Nar prevented the edema induced by native sPLA2, whereas dexamethasone (Dexa), a potent synthetic anti-inflammatory compound, significantly reduced this pharmacologic effect (Figure 3b).

Figure 1. (a) Absorption spectra of sPLA2 and modified sPLA2 after incubation with naringin at wavelength intervals of 200–300 nm. The amino acid modification was analyzed at 280 nm. (b) Amino acid composition of native sPLA2 and sPLA2-Nar. UNK indicates unknown or unidentified peak or extra peaks, identified by the PICO-TAG amino acid analysis system.

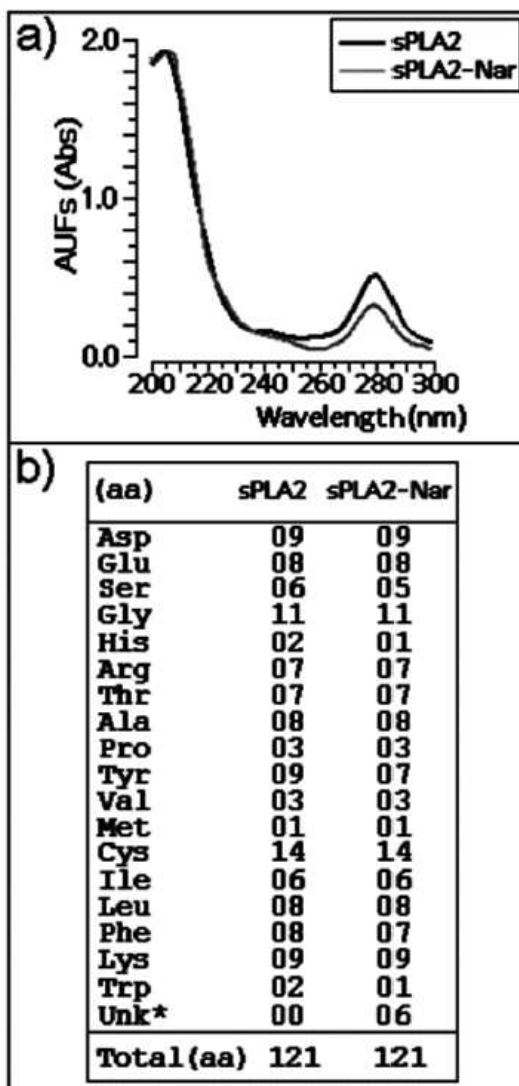


Figure 2. (a) Enzymatic activity. sPLA2-Nar showed a significant decrease compared to native sPLA2 and was similar to sPLA2 treated with 4-bromophenacyl bromide (sPLA2-p-BPB) ($n = 12$, $*P < 0.05$). (b) Measurement of creatine kinase (CK) activity from samples of animals treated with saline (negative control), native sPLA2 (50 μ L, 50 μ g), or (sPLA2-Nar; 50 μ L, 50 μ g). The last bar represents the effect of sPLA2 treated with p-BPB (50 μ L, 50 μ g). Results of creatine kinase levels were expressed as units of enzymatic activity per liter (U/L) of blood. Each column represents six animals, and error bars indicate the S.E.M. $*P < 0.05$ compared with sPLA2 native. (c) Neurotoxic effect of sPLA2 and sPLA2-Nar on the chick biventer cervicis preparation. Results were expressed as a percent modification of twitch tension, and each point represents the mean $\pm$ S.E.M. of five preparations. $*P < 0.05$. (d) The washed platelets assay was performed with venous blood collected from healthy volunteers. The blood was centrifuged in 3.8% trisodium-citrate for 10 minutes at 200 g, and the residue was centrifuged again for 20 minutes at 1,500 g. Aggregations were performed using native sPLA2 and sPLA2-Nar.

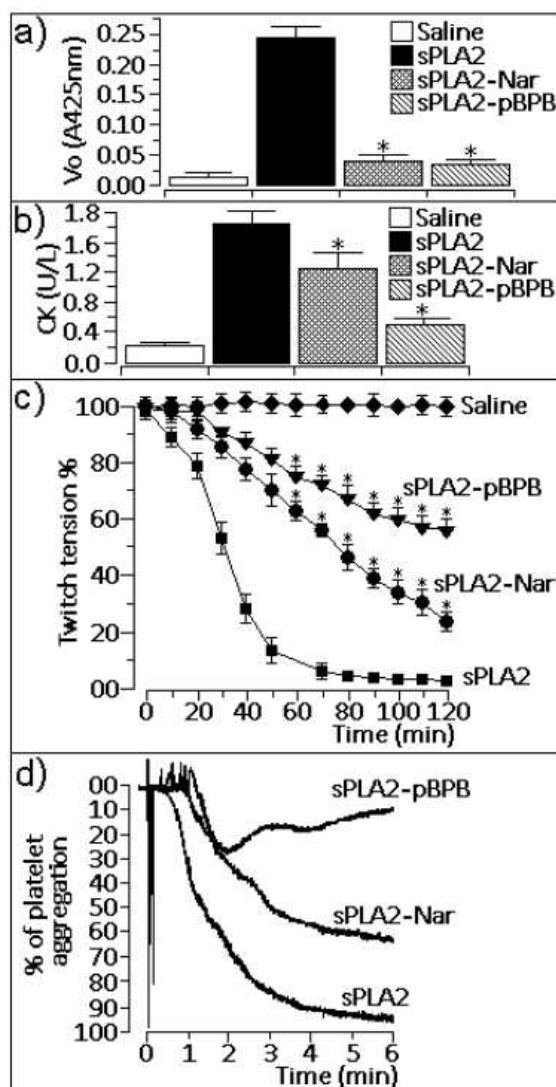
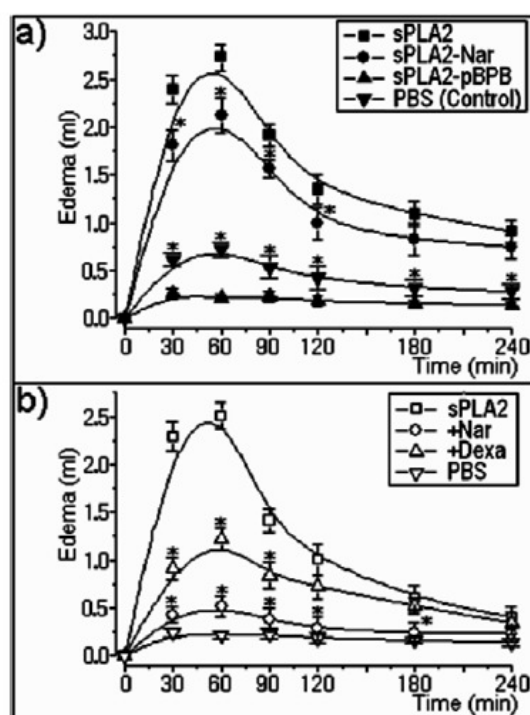


Figure 3. (a) Rat paw edema induced by sPLA2 and sPLA2-Nar showed dose-dependent edema with doses of 10 μ g/paw, whereas p-BPB treatment virtually abolished the edema induced by sPLA2. Observations were conducted at times of 30, 60, 90, 120, 180, and 240 minutes after injection. Results were expressed as the increase in paw volume (mL) calculated by subtracting the basal volume. Each point represents the mean $\pm$ S.E.M. of four rats and *P < 0.05. (b) Effect of previous injection of dexamethasone or naringin (3.0 mg/kg) before injection of native sPLA2. The results were expressed as microliters of plasma protein extravasation. Each point represents the mean of four animals, and each error bar indicates the S.E.M. *p < 0.05 compared with sPLA2 control.



Native sPLA2 showed antibacterial activity against *Xanthomonas axonopodis pv passiflora* and *Streptococcus mutans*. In both cases, we observed that sPLA2 induced a strong modification of the bacterial cell membrane (Figure 4a and 4b). These results suggest that the enzymatic activity of sPLA2 is important for antibacterial activity, and that inhibition of sPLA2 enzymatic activity by naringin virtually abolished its antibacterial activity (Figure 4a and 4b).

We also performed chemical analyses to better understand the effects observed on pharmacological activities. Circular dichroism (CD) measurements of native sPLA2 and sPLA2-Nar showed a significant decrease in the CD signal due to treatment with the flavonoid (Figure 5a). This spectroscopic alteration suggests that the residues modified by naringin are important secondary structural elements.

Mass spectrometry showed that sPLA2 had an increase in its mass-to-charge ratio after naringin treatment in comparison with native sPLA2 (Figure 5b). Similar to the alterations observed in the CD

spectra, the increase in the molecular mass of sPLA2 is a consequence of the chemical modification induced by naringin.

The effect of naringin treatment on sPLA2 from *C. d. cascavella* was evaluated with a systematic structural study. Despite several attempts to crystallize this protein, it was not possible to obtain a high resolution model through X-ray crystallography. Therefore, we employed an alternative strategy to acquire useful structural information to interpret the biochemical and pharmacological results obtained.

Initially, we performed a homology modeling calculation and secondary structure analysis using SWISS-MODEL and PSIPRED web servers, respectively. The *C. d. cascavella* sPLA2 homology model was built based on the template structure of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* snake venom (PDB ID: 2QOG, chain C) [26], which shows 90% sequence identity. According to secondary structure prediction, the model of sPLA2 from *C. d. cascavella* showed the same structural motifs of PLA2: a β -wing, a hydrophobic channel, a calcium-binding loop, and C-terminal regions.

Figure 4. (a) Effect of naringin on the sPLA2 antibacterial activity against *Staphylococcus mutans*. b) Observed structural modifications induced by sPLA2 and sPLA2-Nar on *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*. Saline was used as a control. CFU: Colony Forming Units.

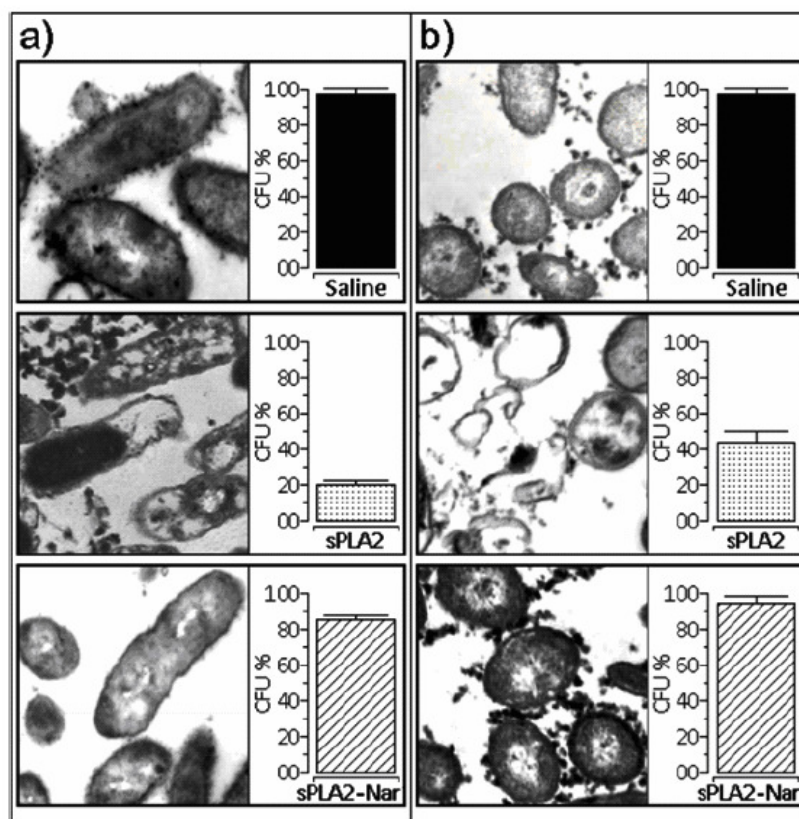
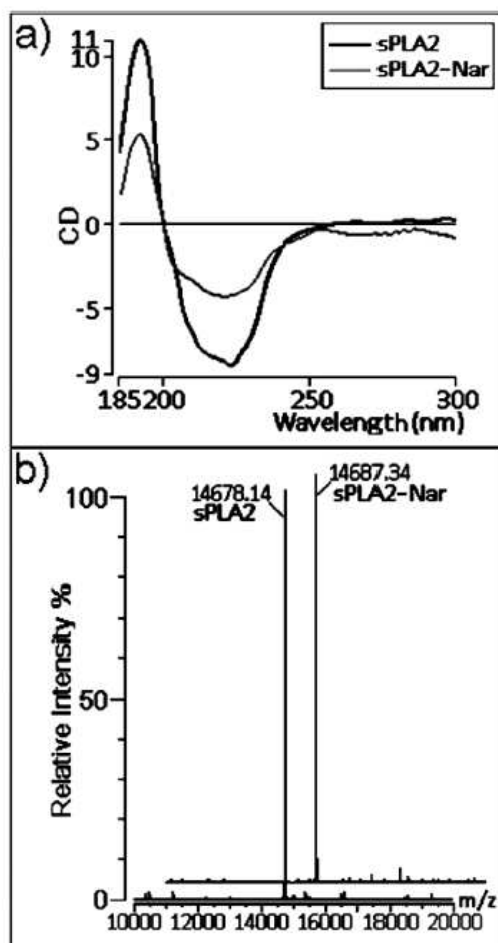
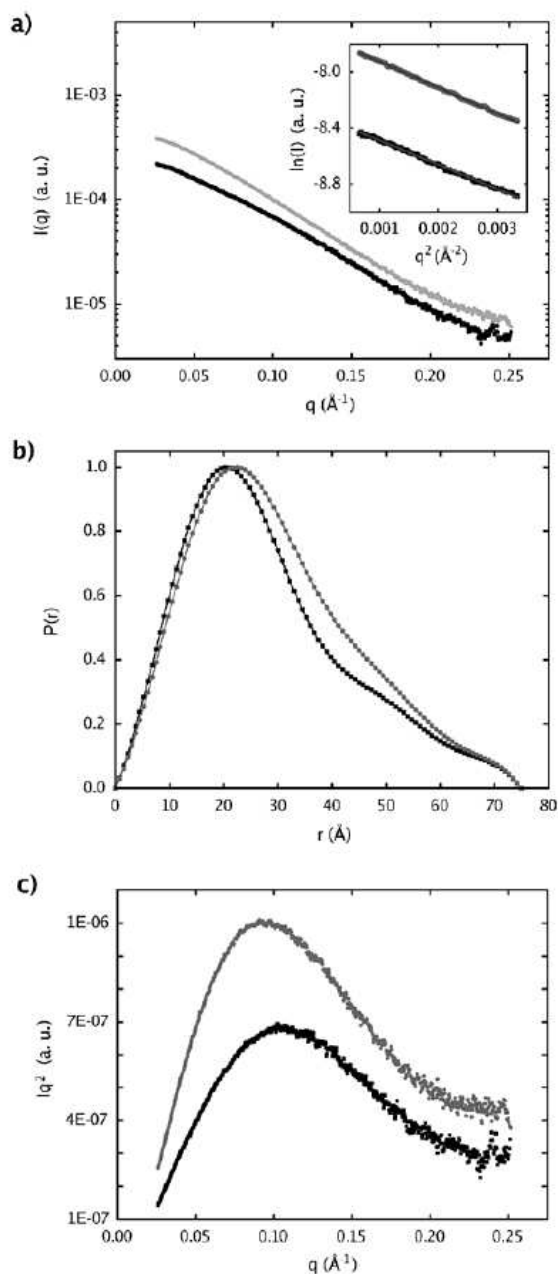


Figure 5. (a) CD spectra of native sPLA2 and sPLA2-Nar. Data over the range of 185–300 nm are shown. The CD spectra are expressed in ellipticity units in millidegrees. (b) The mass measurement of native and naringin-treated sPLA2 by MALDI-TOFF mass spectrometry resulting in a molecular mass of 14,678.14 Da for native sPLA2 and 14,687.34 Da for sPLA2-Nar.



Structural information was also obtained using SAXS in which tertiary and quaternary structures of native sPLA2 and sPLA2-Nar were investigated. The scattering curves for both native and treated sPLA2 with the associated distance distribution functions, and Guinier and Kratky plots are shown in Figure 6. The Guinier plot shown in the inset of Figure 6a exhibits a linear relationship within the interval of $0.026 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.058 \text{ \AA}^{-1}$ for sPLA2 and $0.026 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.056 \text{ \AA}^{-1}$ for sPLA2-Nar, which are characteristic of monodisperse systems and from which the radius of gyration (R_g) of 23 Å and 24 Å were derived, respectively.

Figure 6. Small Angle X-ray Scattering data plots. **(a)** Experimental scattering curves and Guinier region with its linear data fit. **(b)** Distance distribution functions, $p(r)$. **(c)** Kratky plot. Black squares represent the SAXS data for the native protein (sPLA2, ~4 mg/mL), and the SAXS data for the protein after treatment with naringin (sPLA2-Nar, ~7 mg/mL) are shown as gray circles.

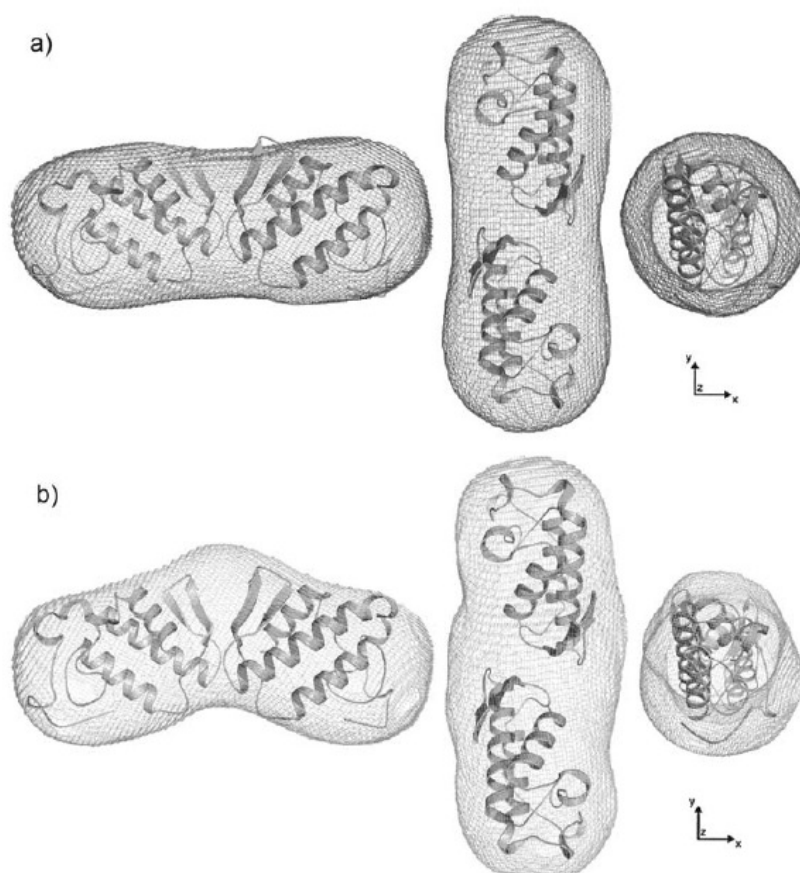


The $p(r)$ functions calculated with GNOM from the scattering curves are shown in Figure 6b. For both native sPLA2 and sPLA2-Nar, the Kratky plot exhibited a characteristic maximum of correctly enovelated proteins (Figure 6c). The radii of rotation calculated for several sPLA2 crystallographic

models with different numbers of molecules in the asymmetric unit (ASU) (PDB ID: 1A2A, 1BJJ, 2QOG, 1CL5, 1JIA, and 2OQD) using the program CRY SOL led to a regular dependency of R_g values with the number of molecules in the ASU: ~ 35 Å for eight, ~ 30 Å for six, ~ 25 Å for four, from 18 to 24 Å for two, and from 13 to 14 Å for one molecule, suggesting that sPLA2 from *C. d. cascavella* in solution, before and after treatment with naringin, is composed of two polypeptide chains.

Determination of the molecular weight with the web tool “SAXS MoW” confirmed that sPLA2 and sPLA2-Nar appear as dimers in solution at the concentrations evaluated, with an average molecular weight of ~ 28 kDa. The expected molecular weight based on the amino acid sequence of sPLA2 is 28.9 kDa. Low resolution models recovered from scattering data showed an elongated shape as expected by the distance distribution functions asymmetric format (Figure 6b). In addition, envelope models of sPLA2-Nar were interestingly different from the native envelopes (Figure 7).

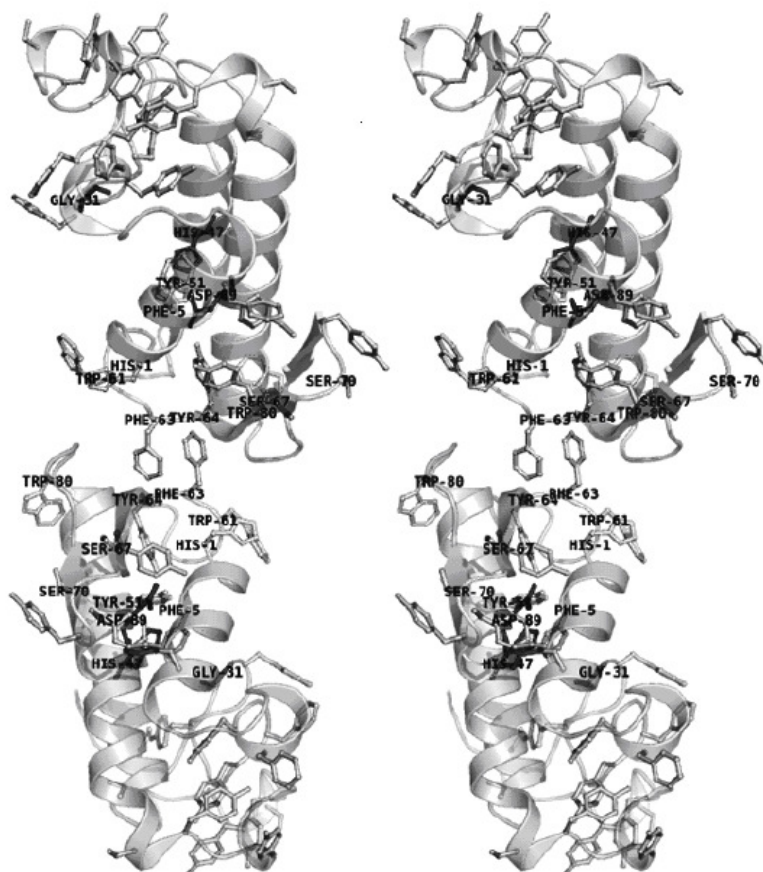
Figure 7. Superimposition of the dimeric high resolution model for agkistrodotoxin sPLA2 (PDB entry 1BJJ, chains A and E) is shown as a cartoon, and SAXS envelopes are shown in dark gray and light gray. **(a)** The native low resolution model obtained is shown in dark gray. **(b)** The envelope of the protein after treatment with naringin is shown in light gray. Envelopes (left) are rotated clockwise by 90° around the y- (middle) and z-axes (right). This figure was prepared using PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA, <http://www.pymol.org>).



According to our models, naringin appears to induce a conformational modification of sPLA2 from *C. d. cascavella*. To interpret such envelopes, different dimer configurations of several sPLA2 crystallographic models found in PDB were superimposed, including dimers formed by symmetric mates (results not shown). Using the program CRY SOL to compare the experimental scattering data and the scattering intensities computed from these models, the lowest discrepancy was found for the dimer made of chains A and E of agkistrodotoxin from *Agkistrodon halys pallas* venom (PDB ID 1BJJ) [27]. Analysis of protein assemblies and interfaces using the PISA web server suggested that assembly of chains A and E of agkistrodotoxin is stable in solution, showing one of the highest ΔdissG , equal to 6.7 kcal/mol.

Finally, the *C. d. cascavella* sPLA2 homology model obtained using the SWISS-MODEL web server was superposed onto chains A and E of the agkistrodotoxin dimer in an attempt to evaluate biochemical and structural alterations in sPLA2 after naringin treatment (Figure 8). This new dimeric assembly built *in silico* for *C. d. cascavella* sPLA2 was then used in the interpretation of the low resolution model bending due to naringin treatment.

Figure 8. Stereo cartoon representation of the *C. d. cascavella* sPLA2 dimer modeled with SWISS-MODEL and built *in silico* based on the high resolution model of agkistrodotoxin sPLA2 (PDB entry 1BJJ, chains A and E. This figure was prepared using PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA, <http://www.pymol.org>).



2.1. Enzymatic activity

Polyphenolic compounds, such as naringin, have been characterized as highly specific and potent inhibitors of phospholipase A2 activity. This action of flavonoids and other polyphenolic compounds is attributed to an ability to bind the hydrophobic catalytic pocket of this enzyme, such as is found in morin, and umbelliferone incubated with sPLA2 [7,8]. In addition, it has been reported that the positions of the hydroxyl groups found in the flavonoid structure (3'- and 4'-position in the B-ring) are important for selective inhibition of sPLA2 activity of group II molecules, such as PLA2s from *Crotalus durissus ssp* and *Bothrops sp* [5].

According to our results, the enzymatic activity of native sPLA2 from *C. d. cascavella* was strongly reduced after treatment with naringin, almost to the same level as the potent sPLA2 enzymatic inhibitor p-BPB (Figure 2a). These findings suggest that naringin and p-BPB may inhibit sPLA2 activity in a different way. Crystallographic studies of sPLA2 from *Bothrops jararacussu* venom have shown that pBPB interacting with His-48 an important residue involved with the catalytic triad, whereas our results suggest that naringin modified several aromatic residues in the hydrophobic channel [28].

2.2. Pharmacological properties

In addition to the enhanced decrease in catalytic activity, sPLA2 inhibitors recognize pharmacological sites of such enzymes, consequently affecting their pharmacological action [29]. As our studies showed, chemical treatment of sPLA2 with naringin reduced some pharmacological effects, including myotoxicity (Figure 2b), neurotoxicity (Figure 2c), pro-platelet aggregation activity (Figure 2d), and edema formation (Figure 3a), which were induced by native sPLA2 in comparison with the same assays performed with the inhibitor p-BPB.

One possible explanation for the lack of association between pharmacological and enzymatic activities is that the chemical modification of some amino acids induced by naringin, in particular aromatic amino acids and histidines, affected the toxin's ability to interact with the pharmacological receptor, but did not lead to abolishment of this function. Our results and those described by Cardoso *et al.* [30] demonstrate that enzymatic activity of sPLA2 is not crucial for pharmacological activities of this sPLA2 isolated from *C. d. cascavella* venom.

In terms of edema formation, it is noteworthy that the pharmacological effect seems to not be correlated with the catalytic activity, and that when naringin was previously applied to animal hindpaws, strong inhibition of hind paw edema was seen (Figure 3b). Flavonoids and other organic compounds from plants, such as flavones and alkaloids, are known to inhibit the enzymatic activity of sPLA2 [2,3], as well as lipoxygenase/cyclooxygenase and cytosolic PLA2, enzymes evolved in the inflammatory cascade [31]. We believe that sPLA2s are responsible for activating these inflammatory enzymes due to arachidonic acid release and initiation of the inflammatory process. Thus, when naringin is previously injected, it inhibits these enzymes and prevents edema formation.

This complementary assay suggests that unlike other pharmacological properties, the edema induced by sPLA2 is dependent on membrane phospholipids hydrolysis generating pharmacologically active lipids. On the other hand, the pharmacological modes of action of sPLA2 on myotoxicity, neurotoxicity, and platelet aggregation are not completely related to the enzymatic activity but may be

involved in the ability of specific sPLA2 molecular regions to recognize pharmacological sites on the cells, as proposed by Cardoso *et al.* [30] for crotoxin, a PLA2 from *Crotalus durissus terrificus* venom.

The antibacterial property induced by native sPLA2 from *C. d. cascavella* appears to be a toxic effect that is more closely related to the enzymatic activity, as was found for other sPLA2 that employ enzymatic catalysis for antibacterial function [32]. Although native sPLA2 showed high phospholipase function, bacterial cell membrane damage was significant. After naringin treatment and pronounced reduction of catalytic activity, the level of lysis was also decreased (Figure 4). Thus, abolishing or altering the sPLA2 enzymatic apparatus led to a significant loss of antibacterial activity by sPLA2 from *C. d. cascavella* venom.

2.3. Chemical and structural modifications

The observed UV absorption modification after sPLA2 treatment with naringin can be mainly attributed to chemical changes in the aromatic amino acid residues and histidines of this enzyme, as verified previously by Iglesias *et al.* [7]. In addition, mass spectrometry analysis demonstrated that the chemical shift induced by naringin was discrete, not indicating an attachment of naringin to the sPLA2 structure. The same result was found in previous studies of sPLA2 treated with umbelliferone [8].

CD spectroscopy showed that naringin treatment induced considerable alteration in the CD signal of sPLA2 as a consequence of modifications of mainly the α -helix. Helical structures in sPLA2 are responsible for forming the hydrophobic channel [18], which is occupied by the acyl chains of the substrate when bound, positioning the cleavage center towards the catalytic residues and forming an aperture to the external surface. In class I and II sPLA2s, when no substrate is bound, the hydrophobic channel is filled with ordered water molecules [33]. Therefore, in addition to our spectroscopic analyses, structural characterization reports suggest that naringin predominantly acted in the hydrophobic channel of sPLA2 from *C. d. cascavella*.

Although side-chain orientation is still a main challenge in determining protein structures from a known sequence [34], methods based on rotamer libraries [35] have improved the prediction reliability in terms of side-chain torsional angles for preferred conformations [34]. However, amino acid side-chains in both crystallographic and molecular modeling models are known to differ from those in physiological conditions [36]. From this point of view and considering the results derived from our current work, the definition of the molecular region where naringin acts is more important than addressing specific interactions and the most probable biologically active side-chain conformations of the important amino acids.

2.4. Dimer models in solution for sPLA2 from *C. d. cascavella*

Structural analyses of native sPLA2 and sPLA2-Nar performed by SAXS indicated that both samples behave as dimers in solution. Using high sequence identity snake venom sPLA2 crystallographic models to interpret our low resolution models, we observed that *C. d. cascavella* dimers presented a new extended configuration that has never been seen for PLA2 in solution.

We also verified that treatment with naringin induced conformational changes in sPLA2 with a clear bending of the dimer. Although unsuccessful, several attempts to model this bent dimer were performed, employing rigid body modeling and flexible docking. However, the interpretation of the

SAXS model based on the *C. d. cascavella* homology model superimposed on the agkistrodotoxin crystallographic “dimer” (PDBID: 1BJJ, chains A and E) enabled identification of the aromatic amino acids, histidine and serine, of *C. d. cascavella* that are present at the dimer interface (Figure 8). These interfacial residues correspond to those affected by the action of naringin, and thus, the chemical modification caused by naringin must be responsible for the conformational change observed in the dimer configuration after naringin treatment.

It has been reported that the dimerization of snake venom sPLA2 is a common event that strongly increases the enzymatic activity of sPLA2 in solution and determines the allosteric behavior of PLA2 from *Crotalus durissus ssp* and *Bothrops sp* [13,37–40]. Our low resolution models for sPLA2 and sPLA-Nar allow us to suggest that in addition to chemical, secondary, and tertiary modifications induced by naringin in sPLA2 from *C. d. cascavella*, dimer bending may have reduced the possible enzymatic allosteric effect presented by this protein.

3. Experimental

3.1. Venom, animals and reagents

Venom from *C. d. cascavella* was kindly donated by the Institute of Butantan (São Paulo, Brazil). Naringin was obtained from Sigma Co., Ltd. (USA). Solvents, chemicals, and reagents used in protein purification and characterization were of HPLC grade or higher and were acquired from Sigma-Aldrich chemicals, Merck (USA), and Bio-Rad (USA). Male and female Wistar rats (120–150 g) and Swiss mice (18–20 g) used in the pharmacological assays were obtained from the Multidisciplinary Center of Biological Investigations (CEMIB-UNICAMP). All animal experiments were approved by the State University of Campinas Ethics Committee (São Paulo, Brazil).

3.2. Purification of sPLA2 from *Crotalus durissus cascavella* venom

Whole venom was first fractionated as previously described by Oliveira *et al.* [41]. Dried venom (45 mg) was dissolved in ammonium bicarbonate buffer (0.2 M, pH 8.0) and clarified by centrifugation (4,500 g, 1 min). The supernatant was injected onto a molecular exclusion HPLC column (Superdex 75, 1 × 60 cm, Pharmacia), and the chromatographic run was developed with a flow rate for fraction elution of 0.2 mL/min. Absorbance was monitored at 280 nm. The separated crotoxin-like fraction was immediately lyophilized. The crotoxin-like fraction was then subjected to reverse phase chromatography using a μ -Bondapack C18 column (0.39 × 30 cm) with a flow rate for fraction elution of 1 mL/min. The chromatography was monitored at 280 nm. sPLA2 from *C. d. cascavella* was eluted using a non-linear gradient with buffer A (0.1% of trifluoroacetic acid in Milli-Q water) and buffer B (acetonitrile 66% in buffer A). The resulting PLA2 was termed sPLA2, and its purity was evaluated by Tricine SDS-PAGE and mass spectrometry on a MALDI-TOF mass spectrometer, as previously described by Toyama *et al.* [37,42].

3.3. Incubation of sPLA2 with naringin and purification of modified sPLA2

The incubation of sPLA2 with naringin (mol:mol) was according to procedures described by Iglesias *et al.* [7]. Naringin was dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO), and its concentration

during incubation with sPLA2 never exceeded 1%. Purified sPLA2 (1.5 mg, 100 nmol/mL) was dissolved in 1 mL of water. After complete homogenization, 10 µL of naringin solution (100 nmol) was added and incubated for 60 minutes in a water bath at 37 °C. Samples (200 µL) were loaded onto a preparative reverse phase HPLC column to separate the modified sPLA2 (sPLA2-Nar) from naringin. Samples were eluted using a discontinuous gradient of buffer (66.6% acetonitrile in 0.1% TFA) at a constant flow rate of 2.0 mL/min. The chromatographic run was monitored at A280 nm. In addition to the chemical modification with naringin, another modification with p-BPB was carried out according to the protocol described by de Castro *et al.* [43] and Hernandez-Oliveira *et al.* [44].

3.4. Measurement of sPLA2 oxidation

Oxidation of sPLA2 after incubation with naringin was determined by measuring the absorption spectra of sPLA2 and sPLA2-Nar using wavelengths ranging from 200 to 300 nm. The chromatographic run was performed utilizing a Waters HPLC, with a 991 photodiode array detector (PDA 991, Waters) to record the absorption spectra of the samples. Detection was carried out at A214 nm, with peak scanning between 190 and 310 nm (3-nm steps). In addition, chemical modification of the amino acid residues of sPLA2 in the presence of naringin was evaluated by amino acid analysis. For this analysis, approximately 1 nmol of purified protein (sPLA2 or sPLA2-Nar) was hydrolyzed with 6 N HCl (200 µL) in the presence of 10 µL of phenol. Amino acid hydrolysis was performed at 106 °C for 24 h. Then, excess HCl was removed, and the hydrolyzed amino acids were redried with an aqueous solution of ethanol:water:triethylamine, 2:2:1 by volume. Post-column derivatization was performed with an aqueous solution of phenylisothiocyanate (ethanol-water:triethylamine-phenylisothiocyanate, 7:1:1:1 by volume). Both samples and amino acid standards were derivatized using a PICO-TAG amino acid analyzer system. The analysis of the phenylthiohydantoin-amino acid was also carried out using a PICO-TAG amino acid analyzer (Waters).

3.5. Measurement of sPLA2 activity

sPLA2 activity was measured following protocols described by Rigden *et al.* [45] and modified by Toyama *et al.* [37] in 96-well plates, using 4-nitro-3-octanoyloxybenzoic acid (4N3OBA, BIOMOL, USA) as substrate. Enzyme activity, expressed as the initial velocity of the reaction (V_0) was calculated based on the increase in absorbance after 20 minutes. All assays were performed with absorbance at 425 nm using a SpectraMax 340 multiwell plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). After addition of native or naringin-treated sPLA2 (20 µg), the reaction mixture was incubated for up to 40 minutes at 37 °C, and absorbance was read at 10-minute intervals.

3.6. Myotoxic activity

Creatine kinase (CK) was assayed using the CK-NAC kit (Laborlab). Native sPLA2, sPLA2-Nar, or sPLA2 treated with p-BPB (sPLA2-p-BPB) (1 µg/µL in 50 µL) was injected into the left *gastrocnemius* muscle of male Wistar rats (90–110 g; $n = 6$). Control rats received an equal volume of 0.15 M NaCl. After 3 hours, the rats were anesthetized, and blood was collected from the abdominal vena cava into tubes containing heparin as an anticoagulant. The plasma was stored at 4 °C for a maximum of 12 hours before assaying. The amount of CK was then determined using 4 µL plasma,

which was incubated for 3 minutes at 37 °C with 1.0 mL of the reagent according to the kit protocol. Activity was expressed in U/L.

3.7. Neurotoxic effect assay

Male chicks (4–8 days old) were killed with ether, and the *biventer cervicis* muscle was removed [46,47] and mounted under a resting tension of 1 g in a 4-mL organ bath containing aerated (95% O₂ + 5% CO₂) Krebs solution (pH 7.5, 37 °C) in mM: 118.7 NaCl, 4.7 KCl, 1.88 CaCl₂, 1.17 KH₂PO₄, 1.17 MgSO₄, 25.0 NaHCO₃, and 11.65 glucose. A bipolar platinum ring electrode was placed around the tendon, which ran the length of the nerve trunk supplying the muscle. Indirect stimulation was applied with a Grass S4 stimulator (0.1 Hz, 0.2 msec, 3–4 mV). Muscle contractions and contractures were recorded by connecting the preparation to a force displacement transducer (Narco Biosystems Inc.) coupled to a Gould RS 3400 recorder. Contractures to exogenously applied acetylcholine (ACh, 55 or 110 µM for 60 seconds) and KCl (5 mM for 120–130 seconds) were obtained in the absence of nerve stimulation prior to the addition of modified and non-modified sPLA₂ (10 µg/mL) at the end of the experiment. The preparations were allowed to stabilize for at least 20 minutes before the addition of ACh or KCl and a single concentration (10 µg/mL) of the compounds.

3.8. Platelet aggregation studies

Platelet aggregation activity was measured following methods described by Fonseca *et al.* [48]. Venous blood was collected following informed consent from healthy volunteers who denied taking any medication in the previous 14 days. Blood was collected with a two-syringe technique using polypropylene syringes and 19-gauge needles, and was immediately transferred into polypropylene tubes containing one-tenth final volume of 3.8% trisodium citrate. After removing the platelet-rich plasma, the remaining blood was prepared by centrifugation of citrated blood at 200 g for 10 min. Washed platelets were obtained from the residue by centrifugation of citrated blood at 1,500 g for 20 min. Platelets were incubated for 1 hour at room temperature to recover their sensitivity to aggregating agents. Platelet counts were performed on a Coulter S Plus apparatus (Coulter Electronics, Hialeah, FL) or with phase-contrast microscopy. Platelet aggregation was carried out using 400 µL of the washed platelets solution in a cuvette and incubated at 37 °C with constant stirring.

The desired concentration of protein was added 3 minutes prior to the addition of platelet aggregation inducers (thrombin for washed platelets). Subsequently, the aggregation was recorded for 5–10 minutes with an aggregometer (Payton Scientific Instruments, Inc, Buffalo, NY). Aggregation experiments were performed with sPLA₂ or sPLA₂-Nar in concentrations of 10 µg in a final volume of 20 µL.

3.9. Paw edema assay

Male Wistar rats (120–150 g) were anaesthetized with halothane (inhaled). Hind paw edema was induced by a single subplantar injection of native sPLA₂ or sPLA₂-Nar (10 µg per paw). Paw volume was measured immediately before the injection of the drugs and at selected times thereafter (30, 60, 90, 120, 180, and 240 minutes) using a hydroplethysmometer (model 7150, Ugo Basile, Italy). All drugs were dissolved in sterile saline solution (0.9%). Results were expressed as the increase in paw

volume (mL) calculated by subtracting the basal volume. When desired, the area under the time–course curve (AUC) was also calculated (trapezoidal rule), and the results were expressed as the total edema volume (mL per paw).

Thus, three groups of rats ($n = 4$ per group) were injected (i.p.) with dexamethasone or naringin (3.0 mg/kg) 30 minutes before the injection of native sPLA2 (10 μg per paw). Each rat received 0.1 mL of drug. Dexamethasone and PBS were used as controls to evaluate the anti-inflammatory effect of naringin.

3.10. Antibacterial activity

The antibacterial activity was assayed as described by Santi-Gadelha *et al.* [49], and structural modification was done according to protocols described by Toyama *et al.* [50]. *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Gram negative) and *Streptococcus mutans* (Gram positive) cells were harvested from fresh agar plates and suspended in sterile distilled water ($A_{600\text{ nm}} = 3 \times 10^8$ CFU/mL). Aliquots of bacterial suspension were diluted to 103 colony-forming units/mL (CFU/mL) and incubated with sPLA2 and sPLA2-Nar samples (75 $\mu\text{g/mL}$) for 60 minutes at 28 °C. Survival was assayed on nutrient agar (Difco) plates ($n = 5$). For both antibacterial assays, electron microscopic assessment of morphologic alterations was performed in the absence (control) or presence of sPLA2 or sPLA2-Nar.

Bacterial samples were centrifuged, recovered, fixed with 4% glutaraldehyde in buffer A (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4) for 1 h at 4 °C, embedded in 3% low-melting temperature agarose (Sea Plaque, FMC Corp.), and stored for 12 h in fixative at 4 °C. Agarose pellets were immersed in fixative for 2 h at 25 °C, washed three times for 10 minutes with buffer A, and fixed with 1% osmium tetroxide for 2 hours at 25 °C. Sections were washed three times, dehydrated in increasing concentrations of ethanol, and embedded in Epon resin. Polymerization occurred at 60 °C for 48 hours, and ultra-thin sections were prepared with a Sorvall MT2 ultramicrotome. Sections were placed on grids and stained with 2% uranyl acetate for 15 minutes, followed by 2.6% lead citrate for 15 minutes. Samples were observed under a LEO 906 transmission electron microscope operating at 40–100 kV.

3.11. Circular dichroism (CD) spectroscopy

Native and sPLA2 modified with naringin were dissolved in phosphate buffer (10 mM, pH 7.4) to a final concentration of $\sim 7\text{ }\mu\text{M}$ and $\sim 4\text{ }\mu\text{M}$ for sPLA2 and sPLA2-Nar, respectively. Samples were transferred to quartz cuvettes with an optical path length of 1 mm. CD spectra between wavelengths 185–300 nm were measured with a JASCO 710 apparatus using a bandwidth of 1 nm and a response time of 2–4 seconds. Scans were collected for each sample, and all spectra were corrected by subtraction of buffer blanks. Comparison of spectra was performed after concentration and optical path length normalization in terms of molar CD.

3.12. Mass spectroscopy

The molecular mass of sPLA2 and sPLA2-Nar were determined by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry using a Voyager-DE PRO MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems). One microliter of samples (sPLA2 and sPLA2-Nar) in 0.1%

TFA was mixed with 2 μ L of the matrix α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, 50% acetonitrile, and 0.1% TFA (v/v). The matrix was prepared with 30% acetonitrile and 0.1% (v/v) TFA. Ion masses were determined with an accelerating voltage of 25 kV, with the laser operated at 2,890 μ J/cm², with a delay of 300 nanoseconds, and in the linear analysis mode.

3.13. Small angle X-ray scattering (SAXS)

SAXS measurements were carried out at the D02A-SAXS2 beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory [51]. Samples were kept at 4 °C in the sample cell [52], and data acquisition was performed taking several 600-second frames for each sample, which allowed for the control of any possible radiation damage and improved statistical errors. Data were collected at a sample-to-detector distance of 985.7 mm using a MAR CCD detector (MAR Research) with X-rays at a wavelength of 1.488 Å, to cover q values ranging from 0.013 to 0.34 Å⁻¹, where q , the moment transfer vector, is defined as $q = 4\pi\sin\theta/\lambda$. Different concentrations of sPLA2 were measured to assess aggregation [53,54] and interparticle interference effects. The best data sets were collected for samples of native sPLA2 and sPLA2-Nar at ~4 mg/mL and ~7 mg/mL, respectively.

Initial data treatment of the scattering intensities was performed using Fit2D software [55]. Data were reduced to a 1D scattering profile and normalized according to intensity and sample attenuation. The net scattered X-ray intensities for the proteins were determined by subtracting a normalized buffer blank from each protein data set. Different frames for each sample were inspected and averaged using the program PRIMUS [56]. Distance distribution functions, $p(r)$, and radius of gyration, R_g , were evaluated by the indirect Fourier transform method included in the program GNOM [57].

The R_g value was also estimated using Guinier analysis [58] in which the $\ln$ of $I(q)$ was plotted against q^2 to yield a straight line whose slope is proportional to R_g . Additional analysis was performed by plotting Iq^2 against q (Kratky plot), which allows the evaluation of the degree of protein globularization [59]. The shape of the Kratky plot is sensitive to the conformational state of the macromolecule in solution. Globularly folded macromolecules have bell-shaped curves, whereas for completely unfolded states, a plateau or a slightly increasing function in the larger q range is observed [60]. Estimation of the molecular weight of sPLA2 and sPLA2-Nar in solution was performed with a relatively simple method included in the “SAXS MoW” web tool (<http://www.ifsc.usp.br/~saxs/saxsmow.html>), which is based on the invariant Q calculated from the Kratky plot [61].

Low resolution envelopes were restored from the scattering curves using the ab initio procedure included in the program GASBOR [62]. In this program, dummy residue models were generated by a random-walk $C\alpha$ chain and folded in a way that minimizes the discrepancy between the calculated scattering curve from the model and the experimental data. To increase the reliability of the results, final models were obtained with the program DAMAVER [63] using a spatial average of 50 independent models. To clarify the visualization, the average model was represented by a surface-calculated model using the program NCSMASK [64]. Superimpositions of crystallographic structures of several PLA2s found in the Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org) and the most probable SAXS models derived from DAMAVER were done using the program SUPCOMB [65]. Crystallographic sPLA2 models used in the interpretation of the low resolution models were chosen based on the smallest discrepancy (χ) between the experimental scattering data and the scattering intensities

computed for these models using the program CRY SOL [66]. In addition, rigid body modeling with the program SASREF [67] and flexible docking with the program package SITUS [68] were performed, aiming for the best interpretation of the SAXS envelopes.

3.14. Additional computational analysis

Automated comparative homology modeling using the SWISS-MODEL web server [69] (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>) was employed to generate an atomic coordinate model for *C. d. cascavella* sPLA2. PSIPRED [70,71] was used for secondary structure prediction (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Protein assemblies and interfaces analyses were performed with the PISA web server [72] (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html).

3.15. Statistical analyses

Results are reported as the means $\pm$ S.E.M. of *n* experiments. The significance of differences between means was assessed by an analysis of variance, followed by a Dunnett's test when several experimental groups were compared with the control group. The confidence limit for significance was 5%.

4. Conclusions

According to our results, the enzymatic activity of native sPLA2 from *C. d. cascavella* was strongly reduced after treatment with naringin, almost to the same level as the potent sPLA2 enzymatic inhibitor p-BPB (Figure 2a). These findings suggest that naringin and p-BPB may inhibit sPLA2 activity in a different way. Crystallographic studies of sPLA2 from *Bothrops jararacussu* venom have shown that pBPB interacting with His-48 an important residue involved with the catalytic triad, whereas our results suggest that naringin modified several aromatic residues in the hydrophobic channel [28].

Based on the chemical modification and CD experiments, naringin interacted predominantly in the sPLA2 molecular region with the highest concentration of aromatic amino acid residues (histidines and serines, shown in Figure 8), which are found at the bottom of the hydrophobic channel (between the N-terminus and the α 2- and α 3-helices) and the β -wing motif. In addition to containing the majority of the modified amino acid residues, the hydrophobic channel is also the sPLA2 structural domain responsible for catalysis, comprising the catalytic triad: Gly31, His47, and Asp89 according to the sPLA2 amino acid sequence (shown in Figure 8). Thus, chemical and structural modifications in this enzymatic region by naringin may be the main reason for the inhibition of enzymatic activity and the correlated edema formation and antibacterial functions of sPLA2 from *C. d. cascavella*.

The structural studies we performed permitted identification of the probable region in *C. d. cascavella* sPLA2 that was affected by naringin. This region seems to be responsible for some of the pharmacological properties of this enzyme. Chemical and structural modifications also interfered with the active site of sPLA2 and affected its possible enzymatic allosteric behavior.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the National Laboratory of Synchrotron Light (LNLS) for the use of the Small Angle X-ray Scattering beamlines under proposal D11A-SAXS1-5366. We are also grateful to Daniel Razzo for helping with CD data collection. This work was supported by CNPq, FAPESP, and FAEPEX/PRP/UNICAMP

References and Notes

1. Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A.; Capasso, F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* **1999**, *65*, 337-353.
2. Fawzy, A.; Vishwanath, B.; Franson, R. Inhibition of human non-pancreatic phospholipases A2 by retinoids and flavonoids. Mechanism of action. *Agents Actions* **1988**, *25*, 394-400.
3. Vishwanath, B.; Fawzy, A.; Franson, R. Edema-inducing activity of phospholipase A2 purified from human synovial fluid and inhibition by aristolochic acid. *Inflammation* **1988**, *12*, 549-561.
4. Guardia, T.; Rotelli, A.; Juárez, A.; Pelzer, L. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmaco* **2001**, *56*, 683-687.
5. Lindahl, M.; Tagesson, C. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: Importance of their structure for selective inhibition of group ii phospholipase A2. *Inflammation* **1997**, *21*, 347-356.
6. Rotelli, A.; Guardia, T.; Juárez, A.; de la Rocha, N.; Pelzer, L. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol. Res.* **2003**, *48*, 601-606.
7. Iglesias, C.; Aparicio, R.; Rodrigues-Simioni, L.; Camargo, E.; Antunes, E.; Marangoni, S.; de Oliveira Toyama, D.; Beriam, L.; Monteiro, H.; Toyama, M. Effects of morin on snake venom phospholipase A2 (PLA2). *Toxicon* **2005**, *46*, 751-758.
8. Toyama, D.; Marangoni, S.; Diz-Filho, E.; Oliveira, S.; Toyama, M. Effect of umbelliferone (7-hydroxycoumarin, 7-hoc) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A2 (sPLA2) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *Toxicon* **2009**, *53*, 417-426.
9. Cirino, G. Multiple controls in inflammation. Extracellular and intracellular phospholipase A2, inducible and constitutive cyclooxygenase, and inducible nitric oxide synthase. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 105-111.
10. Fuentes, L.; Hernández, M.; Nieto, M.; Sánchez Crespo, M. Biological effects of group iia secreted phospholipase a(2). *FEBS Lett.* **2002**, *531*, 7-11.
11. Gil, B.; Sanz, M.; Terencio, M.; Gunasegaran, R.; Payá, M.; Alcaraz, M. Morelloflavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholipase A2 with anti-inflammatory activity. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *53*, 733-740.
12. Câmara, P.; Esquisatto, L.; Camargo, E.; Ribela, M.; Toyama, M.; Marangoni, S.; De Nucci, G.; Antunes, E. Inflammatory edema induced by phospholipases A2 isolated from *Crotalus durissus* sp. in the rat dorsal skin: A role for mast cells and sensory c-fibers. *Toxicon* **2003**, *41*, 823-829.
13. Lee, W.; Toyama, M.; Soares, A.; Giglio, J.; Marangoni, S.; Polikarpov, I. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of piratoxin iii, a d-49 phospholipase A2 from the venom of *Bothrops pirajai*. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **1999**, *55*, 1229-1230.

14. Benavente-García, O.; Castillo, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J. Agric. Food. Chem.* **2008**, *56*, 6185-6205.
15. Hodek, P.; Trefil, P.; Stiborová, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes p450. *Chem. Biol. Interact.* **2002**, *139*, 1-21.
16. Benavente-García, O.; Castillo, J.; Marin, F.R.; Ortuño, A.; Del Río, J.A. Uses and properties of citrus flavonoids. *J. Agric. Food. Chem.* **1997**, *45*, 11.
17. Svergun, D.; Koch, M. Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 654-660.
18. Arni, R.; Ward, R. Phospholipase A2 a structural review. *Toxicon* **1996**, *34*, 827-841.
19. Burke, J.; Dennis, E. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid. Res.* **2009**, *50*, S237-S242.
20. Arni, R.; Fontes, M.; Barberato, C.; Gutiérrez, J.; Díaz, C.; Ward, R. Crystal structure of myotoxin ii, a monomeric lys49-phospholipase A2 homologue isolated from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *366*, 177-182.
21. Murakami, M.; Viçoti, M.; Abrego, J.; Lourenzoni, M.; Cintra, A.; Arruda, E.; Tomaz, M.; Melo, P.; Arni, R. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA2-active site-like region are essential requirements for the activity of lys49 PLA2 homologues. *Toxicon* **2007**, *49*, 378-387.
22. Arni, R.; Ward, R.; Gutierrez, J.; Tulinsky, A. Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **1995**, *51*, 311-317.
23. Dos Santos, M.; Fagundes, F.; Teixeira, B.; Toyama, M.; Aparicio, R. Purification and preliminary crystallographic analysis of a new lys49-pla2 from *B. jararacussu*. *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 736-750.
24. Ward, R.; de Azevedo, W.J.; Arni, R. At the interface: crystal structures of phospholipases A2. *Toxicon* **1998**, *36*, 1623-1633.
25. da Silva Giotto, M.; Garratt, R.; Oliva, G.; Mascarenhas, Y.; Giglio, J.; Cintra, A.; de Azevedo, W.J.; Arni, R.; Ward, R. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: Conformational changes in bothropstoxin i, a dimeric lys49-phospholipase A2 homologue. *Proteins* **1998**, *30*, 442-454.
26. Marchi-Salvador, D.; Corrêa, L.; Magro, A.; Oliveira, C.; Soares, A.; Fontes, M. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin b from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Proteins* **2008**, *72*, 883-891.
27. Tang, L.; Zhou, Y.; Lin, Z. Structure of agkistrodotoxin in an orthorhombic crystal form with six molecules per asymmetric unit. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **1999**, *55*, 1986-1996.
28. Magro, A.; Takeda, A.; Soares, A.; Fontes, M. Structure of btha-i complexed with p-bromophenacyl bromide: possible correlations with lack of pharmacological activity. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2005**, *61*, 1670-1677.
29. Boilard, E.; Rouault, M.; Surrel, F.; Le Calvez, C.; Bezzine, S.; Singer, A.; Gelb, M.; Lambeau, G. Secreted phospholipase A2 inhibitors are also potent blockers of binding to the m-type receptor. *Biochemistry* **2006**, *45*, 13203-13218.

30. Cardoso, D.; Lopes-Ferreira, M.; Faquim-Mauro, E.; Macedo, M.; Farsky, S. Role of crotoxin, a phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. *Mediators. Inflamm.* **2001**, *10*, 125-133.
31. Middleton, E.J.; Kandaswami, C.; Theoharides, T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 673-751.
32. Nevalainen, T.; Graham, G.; Scott, K. Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review. *Biochim. Biophys. Acta.* **2008**, *1781*, 1-9.
33. Scott, D.; Sigler, P. Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A2. *Adv. Protein. Chem.* **1994**, *45*, 53-88.
- Rigden, D.; Hwa, L.; Marangoni, S.; Toyama, M.; Polikarpov, I. The structure of the d49 phospholipase A2 piratoxin iii from *Bothrops pirajai* reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: Possible relationship to cooperative substrate binding. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2003**, *59*, 255-262.
34. Al-Lazikani, B.; Jung, J.; Xiang, Z.; Honig, B. Protein structure prediction. *Curr. Op. Chem. Biol.* **2001**, *51*-56.
35. Ponder, J.; Richards, F. Tertiary templates for proteins. Use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes. *J. Mol. Biol.* **1987**, *193*, 775-791.
36. Levitt, M.; Gerstein, M.; Huang, E.; Subbiah, S.; Tsai, J. Protein folding: the endgame. *Ann. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 549-579.
37. Toyama, M.; de Oliveira, D.; Beriam, L.; Novello, J.; Rodrigues-Simioni, L.; Marangoni, S. Structural, enzymatic and biological properties of new PLA(2) isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon* **2003**, *41*, 1033-1038.
38. Toyama, M.; Mancuso, L.; Giglio, J.; Novello, J.; Oliveira, B.; Marangoni, S. A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins-i and ii, two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom. N-terminal sequencing. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1995**, *37*, 1047-1055.
39. Soares, A.; Rodrigues, V.; Homs-Brandeburgo, M.; Toyama, M.; Lombardi, F.; Arni, R.; Giglio, J. A rapid procedure for the isolation of the lys-49 myotoxin ii from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. *Toxicon* **1998**, *36*, 503-514.
40. Diz Filho, E.; Marangoni, S.; Toyama, D.; Fagundes, F.; Oliveira, S.; Fonseca, F.; Calgarotto, A.; Joazeiro, P.; Toyama, M. Enzymatic and structural characterization of new PLA2 isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*. *Toxicon* **2009**, *53*, 104-114.
41. de Oliveira, D.; Toyama, M.; Martins, A.; Havt, A.; Nobre, A.; Marangoni, S.; Câmara, P.; Antunes, E.; de Nucci, G.; Beliam, L.; Fonteles, M.; Monteiro, H. Structural and biological characterization of a crotapotin isoform isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon* **2003**, *42*, 53-62.
42. Toyama, M.; Toyama, D.; Joazeiro, P.; Carneiro, E.; Beriam, L.; Marangoni, L.; Boscherio, A. Biological and structural characterization of a new PLA2 from the *Crotalus durissus collilineatus* venom. *Protein J.* **2005**, *24*, 103-112.

43. de Castro, R.; Landucci, E.; Toyama, M.; Giglio, J.; Marangoni, S.; De Nucci, G.; Antunes, E. Leucocyte recruitment induced by type ii phospholipases A(2) into the rat pleural cavity. *Toxicon* **2000**, *38*, 1773-1785.
44. Hernandez-Oliveira, S.; Toyama, M.; Toyama, D.; Marangoni, S.; Hyslop, S.; Rodrigues-Simioni, L. Biochemical, pharmacological and structural characterization of a new PLA2 from *Crotalus durissus terrificus* (south american rattlesnake) venom. *Protein J.* **2005**, *24*, 233-242.
45. Rigden, D.; Hwa, L.; Marangoni, S.; Toyama, M.; Polikarpov, I. The structure of the d49 phospholipase A2 piratoxin iii from *Bothrops pirajai* reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: Possiblere relationship to cooperative substrate binding. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2003**, *59*, 255-262.
46. Ginsborg, B.; Warriner, J. The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1960**, *15*, 410-411.
47. Belo, C.; Leite, G.; Toyama, M.; Marangoni, S.; Corrado, A.; Fontana, M.; Southan, A.; Rowan, E.; Hyslop, S.; Rodrigues-Simioni, L. Pharmacological and structural characterization of a novel phospholipase A2 from *Micrurus dumerilii carinicauda* venom. *Toxicon* **2005**, *46*, 736-750.
48. Fonseca, F.; Antunes, E.; Morganti, R.; Monteiro, H.; Martins, A.; Toyama, D.; Marangoni, S.; Toyama, M. Characterization of a new platelet aggregating factor from crotoxin *Crotalus durissus cascavella* venom. *Protein J.* **2006**, *25*, 183-192.
49. Santi-Gadelha, T.; Rocha, B.; Oliveira, C.; Aragão, K.; Marinho, E.; Gadelha, C.; Toyama, M.; Pinto, V.; Nagano, C.; Delatorre, P.; Martins, J.; Galvani, F.; Sampaio, A.; Debray, H.; Cavada, B. Purification of a pha-like chitin-binding protein from acacia farnesiana seeds: A time-dependent oligomerization protein. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2008**, *150*, 97-111.
50. Toyama, M.; Toyama, D.O.; Passero, L.; Laurenti, M.; Corbett, C.; Tomokane, T.; Fonseca, F.; Antunes, E.; Joazeiro, P.; Beriam, L.; Martins, M.; Monteiro, H.; Fonteles, M. Isolation of a new l-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon* **2006**, *47*, 47-57.
51. Kellermann, G.; Vicentin, F.; Tamura, E.; Rocha, M.; Tolentino, H.; Barbosa, A.; Craievich, A.; Torriani, I. The small-angle x-ray scattering beamline of the brazilian synchrotron light laboratory. *J. Appl. Cryst.* **1997**, *30*, 4.
52. Cavalcanti, L.; Torriani, I.; Plivelic, T.; Oliveira, C.; Kellermann, G.; Neuenschwander, R. Two new sealed sample cells for small angle x-ray scattering from macromolecules in solution and complex fluids using synchrotron radiation. *Rev. Scient. Instrum.* **2004**, 4541-4546.
53. Svergun, D.; Koch, M. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Rep. Progres. Physics.* **2003**, 1735-1782.
54. Tsutakawa, S.; Hura, G.; Frankel, K.; Cooper, P.; Tainer, J. Structural analysis of flexible proteins in solution by small angle x-ray scattering combined with crystallography. *J. Struct. Biol.* **2007**, *158*, 214-223.
55. Hammersley, A.; Svensson, S.; Hanfland, M.; Fitch, A.; Hausermann, D. Two-dimensional detector software: From real detector to idealised image or two-theta scan. *High. Press. Res.* **1996**, 235-248.
56. Konarev, P.; Volkov, V.; Sokolova, A.; Koch, M.; Svergun, D. Primus: A windows pc-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.* **2003**, 1277-1282.

57. Svergun, D. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Cryst.* **1992**, 495-503.
58. Guinier, A.; Fournet, G. *Small-Angle Scattering of x-Rays*; John Wiley & Sons: New York, NY, USA, 1955.
59. Semisotnov, G.; Kihara, H.; Kotova, N.; Kimura, K.; Amemiya, Y.; Wakabayashi, K.; Serdyuk, I.; Timchenko, A.; Chiba, K.; Nikaido, K.; Ikura, T.; Kuwajima, K. Protein globularization during folding. A study by synchrotron small-angle x-ray scattering. *J. Mol. Biol.* **1996**, 262, 559-574.
60. Putnam, C.; Hammel, M.; Hura, G.; Tainer, J. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q. Rev. Biophys.* **2007**, 40, 191-285.
61. H. Fischer, M.d.O.N., H. B. Napolitano, I. Polikarpov and A. F. Craievich. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle x-ray scattering measurement on a relative scale. *J. Appl. Cryst.* **2010**, 43, 9.
62. Svergun, D.; Petoukhov, M.; Koch, M. Determination of domain structure of proteins from x-ray solution scattering. *Biophys. J.* **2001**, 80, 2946-2953.
63. Volkov, V.; Svergun, D. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Cryst.* **2003**, 860-864.
64. CCP4 High-throughput structure determination. In Proceedings of the 2002 ccp4 (collaborative computational project in macromolecular crystallography) study weekend, York, UK, 2002. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* D58.
65. Kozin, M.; Svergun, D. Automated matching of high- and low-resolution structural models. *J. Appl. Cryst.* **2001**, 33-41.
66. Svergun, D.; Barberato, C.; Koch, M.H.J. *Crysol* - a program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Cryst.* **1995**, 28, 6.
67. Petoukhov, M.; Svergun, D. Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophys. J.* **2005**, 89, 1237-1250.
68. Wriggers, W.; Milligan, R.; McCammon, J. Situs: A package for docking crystal structures into low-resolution maps from electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **1999**, 125, 185-195.
69. Schwede, T.; Kopp, J.; Guex, N.; Peitsch, M. Swiss-model: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic. Acids. Res.* **2003**, 31, 3381-3385.
70. Jones, D. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **1999**, 292, 195-202.
71. McGuffin, L.; Bryson, K.; Jones, D. The psipred protein structure prediction server. *Bioinformatics* **2000**, 16, 404-405.
72. Krissinel, E.; Henrick, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **2007**, 372, 774-797.

Sample Availability: Contact the authors.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Short communication

Effect of the synthetic coumarin, ethyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate, on activity of *Crotalus durissus ruruima* sPLA2 as well as on edema and platelet aggregation induced by this factor

F.V. Fonseca^{a,f}, L. Baldissera Jr.^b, E.A. Camargo^b, E. Antunes^b, E.B.S. Diz-Filho^{a,f}, A.G. Corrêa^c, L.O.S. Beriam^d, D.O. Toyama^e, C.A. Cotrim^{a,f}, M.H. Toyama^{f,*}

^a Biochemistry Department, Institute of Biology, UNICAMP, Campinas, Brazil

^b Pharmacology Department, Faculty Medicine, UNICAMP, Campinas, Brazil

^c Department of Chemistry, UFScar, Brazil

^d Laboratory of Vegetal Bacteriology, Centro Experimental do Instituto Biológico, Campinas, São Paulo, Brazil

^e CCBS, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, Brazil

^f UNESP, Campus Experimental do Litoral Paulista, São Vicente, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 November 2009

Received in revised form 1 March 2010

Accepted 3 March 2010

Available online 16 March 2010

Keywords:

Crotalus durissus ruruima

Edema

Myonecrosis

Platelet

sPLA2

Synthetic coumarin

ABSTRACT

We show that ethyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (EOCC), a synthetic coumarin, irreversibly inhibits phospholipase A₂ (sPLA2) from *Crotalus durissus ruruima* venom (sPLA2r) with an IC₅₀ of 3.1 ± 0.06 nmol. EOCC strongly decreased the V_{max} and K_m , and it virtually abolished the enzyme activity of sPLA2r as well as sPLA2s from other sources. The edema induced by sPLA2r + EOCC was less than that induced by sPLA2r treated with *p*-bromophenacyl bromide, which was more efficient at neutralizing the platelet aggregation activity of native sPLA2r. Native sPLA2r induced platelet aggregation of $91.54 \pm 9.3\%$, and sPLA2r + EOCC induced a platelet aggregation of $18.56 \pm 6.5\%$. EOCC treatment also decreased the myotoxic effect of sPLA2r. Mass spectrometry showed that EOCC formed a stable complex with sPLA2r, which increased the mass of native sPLA2r from 14,299.34 Da to 14,736.22 Da. Moreover, the formation of this complex appeared to be involved in the loss of sPLA2r activity. Our results strongly suggest that EOCC can be used as a pharmacological agent against the sPLA2 in *Crotalus durissus* sp. venom as well as other sPLA2s.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

2H-1-benzopyrans (2H-chromenes) are important intermediates in the synthesis of many natural products and medicinal agents (Ashwood et al., 1986; Kim and Lee, 2002) including flavonoids, coumarin, and derivatives of these compounds. 2-H chromenes have been used experimentally

as anti-inflammatory and anti-thrombotic therapeutics. Related to their anti-inflammatory activity, synthetic coumarins are known to inhibit arachidonic acid metabolism. *Crotalus durissus* sp. venom has several pharmacological effects that appear dependent, at least in part, on the enzymatic activity of secretory phospholipase A₂ (sPLA2). The aim of this work was to evaluate the effect of ethyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (EOCC), a synthetic coumarin derivative, on the enzymatic activity of sPLA2 from *Crotalus durissus ruruima* venom (sPLA2r) as well as on sPLA2r-induced edema, myotoxicity, and platelet aggregation.

Secretory PLA2r was fractionated in two steps as described by Diz Filho et al. (2009). Whole venom (45 mg)

Abbreviations: CK, creatine kinase; EOCC, ethyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate; 7-HOC, 7-hydroxycoumarin; pBPB, *p*-bromophenacyl bromide; PLA2, phospholipase A₂; sPLA2, secretory phospholipase A₂; sPLA2r, secretory phospholipase A₂ from *Crotalus durissus ruruima*.

* Corresponding author. UNESP, Campus do Litoral Paulista, Pça. Infante D. Henrique, s/n° CEP 11330-900, São Vicente, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 13 3569 9400; fax: +55 13 3569 9446.

E-mail address: mhtjpn@yahoo.com (M.H. Toyama).

was first fractionated by size-exclusion HPLC (Superdex 75, 1 × 60 cm, GE Healthcare), and the crotoxin fraction was purified by monitoring phospholipase A₂ (PLA₂) activity (Fig. 1a). Crotoxin was then subjected to reverse-phase HPLC, which led to the identification of one main sPLA₂ isoform (Fig. 1b). The molecular mass of purified sPLA₂r was 14,299.34 Da, measured as described by Toyama et al. (2005).

Purified sPLA₂r was chemically modified with EOCC using the procedure described by Iglesias et al. (2005). EOCC (100 nmol in 10 µL dimethyl sulfoxide) was incubated with sPLA₂r (100 nmol in 1000 µL water) for 60 min at 37 °C. The products were fractionated by analytical reverse-phase HPLC (C5 large pore column, Supelco). The resulting sPLA₂r had a molecular mass of 14,736.22 Da. This, taken with the

14,299.34 Da mass of native sPLA₂r, suggests that two molecules of EOCC (218.21 Da) were complexed to sPLA₂r.

Amino acid analysis of native or treated sPLA₂r samples was performed using the PICO-TAG system (Waters). Samples were hydrolyzed with 6N HCl in the presence of 1% of phenol over 24 h and derivatized with PITC. PTC-amino acids were then analyzed by reverse-phase HPLC. The global amino acid analysis revealed no significant differences between native sPLA₂r and EOCC-treated sPLA₂r (sPLA₂ + EOCC).

PLA₂ activity was measured using a chromogenic substrate (4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid, BIOMOL, USA) as described by Lima et al. (2008). The enzymatic activity, expressed as the initial velocity of the reaction (V_0), was calculated based on the increase in absorbance at 425 nm after 20 min. Absorbance was measured using a Spectramax 340 multiwell plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Native sPLA₂r had a V_0 of 2.51 ± 0.34 nmol/min ($n = 12$). The chemical modification of sPLA₂r with pBPB was done as described by de Castro et al. (2000). The V_0 decreased to 0.48 ± 0.13 nmol/min ($n = 12$, $p < 0.05$) in the presence of the sPLA₂ inhibitor, *p*-bromophenacyl bromide (pBPB). Similar to pBPB, EOCC decreased the V_0 of sPLA₂r to 0.38 ± 0.08 nmol/min ($n = 12$, $p < 0.05$). These results strongly suggest that EOCC and pBPB have comparable inhibitory potency against sPLA₂r. To compare the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of EOCC and pBPB, we used a substrate concentration of 10 mM and incubated sPLA₂r with increasing amounts of each inhibitor (0–14 nmol in 10 µL) for 60 min prior to enzymatic evaluation. EOCC inhibited enzymatic activity in a dose-dependent manner, with maximal inhibition occurring in the presence of 8 nmol and no significant further inhibitory effect being seen with doses of 10–14 nmol (Fig. 2a). The inhibitory effect of EOCC was significantly higher than that observed for pBPB at lower doses (2–8 nmol), but both showed similar inhibitory effects above 10 nmol. Next, we evaluated the effect of the substrate concentration on sPLA₂r activity following the protocol described by Toyama et al. (2003). At different substrate concentrations, sPLA₂r exhibited moderate allosteric behaviour. The addition of EOCC or pBPB to the enzyme strongly and irreversibly decreased the V_{max} and K_m (Fig. 2b). The enzymatic assay was performed as already described and in all cases, 1 mg/mL sPLA₂ solution was incubated with 10 nmol EOCC for 30 min before the enzymatic assay. A comparison EOCC-induced inhibition of sPLA₂r and sPLA₂ from other sources produced the following results (listed without and with EOCC): 7.83 ± 0.56 and 0.98 ± 0.32 nmol/min for bovine sPLA₂; 6.53 ± 0.28 and 2.32 ± 0.17 nmol/min for honey bee sPLA₂; 11.43 ± 0.47 and 1.83 ± 0.53 nmol/min for *Naja mossambica mossambica* sPLA₂ (Sigma–Aldrich, V1627); 8.78 ± 0.62 and 0.56 ± 0.12 nmol/min for PrTx-III sPLA₂ from *Bothrops pirajai* venom; 10.4 ± 0.31 and 1.83 ± 0.35 nmol/min for sPLA₂r ($n = 12$, Fig. 2c).

Next, we analyzed the effect of EOCC on sPLA₂r-induced edema. Male Wistar rats (120–150 g) were anaesthetized with inhaled halothane, and hind paw edema was induced by a single subplantar injection of native or modified sPLA₂ (10 µg dissolved in sterile 0.9% saline solution per paw). Paw volume was measured using a hydroplethysmometer (model 7150, Ugo Basile, Italy) immediately before the

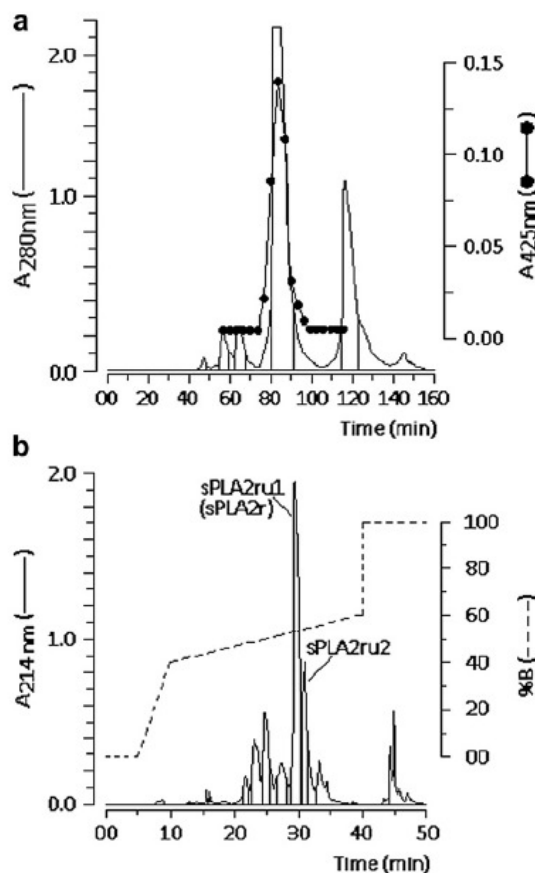


Fig. 1. (a) Chromatographic profile of *Crotoalus durissus ruruima* whole-venom fractionation by size-exclusion chromatography (Superdex 75, 1 × 60 cm). Clarified, dried venom (45 mg) was dissolved in the mobile phase (0.2 M ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0) and separated using a flow rate of 0.2 mL/min. Fractions were eluted by monitoring absorbance at 280 nm. Enzyme activity was monitored in 10–20 µL samples from each fraction corresponding to crotoxin, convulxin, girosin, crotoxin, and crotoamine. PLA₂ activity was detected in the crotoxin fraction and monitored spectrophotometrically at 425 nm. (b) Fractionation of crotoxin from *Crotoalus durissus ruruima* by reverse-phase HPLC (C18 µ-Bondapak) using a non-linear gradient of acetonitrile (66% in 0.1% of TFA) and monitoring at $A_{214\text{ nm}}$. The purity of the resulting fractions, termed sPLA₂ru1 and sPLA₂ru2, was evaluated by tricine SDS-PAGE and mass spectrometry on a MALDI-TOF instrument. The main sPLA₂ fraction used in this work was designated sPLA₂r.

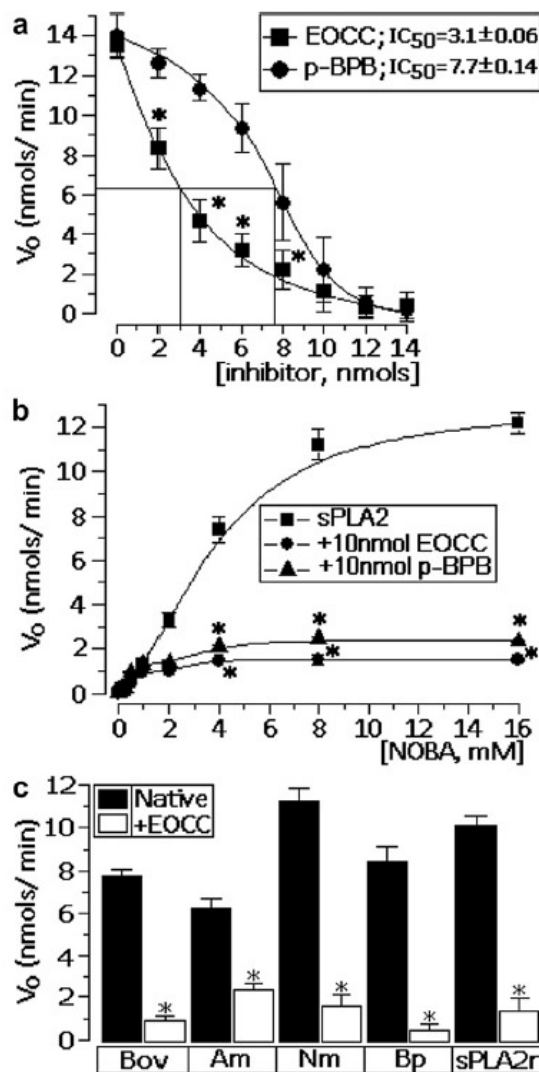


Fig. 2. (a) The effect of increasing concentrations of EOCC or pBPB (0–14 nmol/L) on the activity of sPLA2r (10 nmol/mL). Each compound was incubated with sPLA2r for 60 min, and sPLA2r was then added to the reaction well. sPLA2 activity was measured using 4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid as a substrate. Enzyme activity, expressed as the initial velocity of the reaction (V_0), was calculated based on the increase in absorbance at 425 nm after 20 min. (b) The effect of varying substrate concentrations (0–16 mM) on the enzymatic activity of sPLA2r, which exhibited discrete allosteric behaviour. Using the same conditions, we also evaluated the effect of 10 nmol pBPB or EOCC on sPLA2r kinetics. (c) Comparison of the inhibitory effect of EOCC against sPLA2r from other sources. In all assays, 10 nmol EOCC was incubated with the sPLA2 solution (1 mg/mL) for 30 min before the enzymatic assay. Each point represents mean $\pm$ SEM ($n = 12$). * $p < 0.05$.

injection and at selected times thereafter (30, 60, 90, 120, 180 and 240 min). Results were expressed as the increase in the paw volume (in mL) from the basal volume. Native sPLA2r induced maximum edema at 30 min after injection (0.63 ± 0.03 mL, $n = 4$). Incubation of sPLA2r with EOCC virtually abolished edema formation at this time (0.18 ± 0.05 mL, $n = 4$, $p < 0.05$). Similar results were seen with pBPB (0.24 ± 0.04 mL, $n = 4$, $p < 0.05$) (Fig. 3a).

Liberation of creatine kinase (CK) from damaged muscle cells was assessed by measuring CK enzyme activity in the plasma of mice. Four groups of four animals (18–22 g) were injected in the right gastrocnemius muscle with 50 μ L of 0.5 mg/mL native sPLA2r, sPLA2r-treated EOCC, EOCC alone, or PBS (as a control). Three hours later, tail blood was collected into heparinized tubes for analysis of plasma CK activity (expressed as units per liter at 30 °C) using a commercially available kit (47-UV, Sigma Aldrich). After injection of native sPLA2r, CK activity was 2195.45 ± 42.34 U/L ($n = 4$, $p < 0.05$), whereas EOCC-treated sPLA2r increased CK levels only to 421.34 ± 24.56 ($n = 4$, $p < 0.05$). Myonecrosis was also strongly inhibited by pBPB, as shown by a comparable increase in CK activity to 383.87 ± 28.23 U/L ($n = 4$, $p < 0.05$).

Finally, platelet aggregation was measured following the method described by Fonseca et al. (2006) and Oliveira et al. (2008). The washed platelet solution (400 μ L) was kept at 37 °C with constant stirring, and aggregation was recorded for 5–10 min with an aggregometer (Payton Scientific

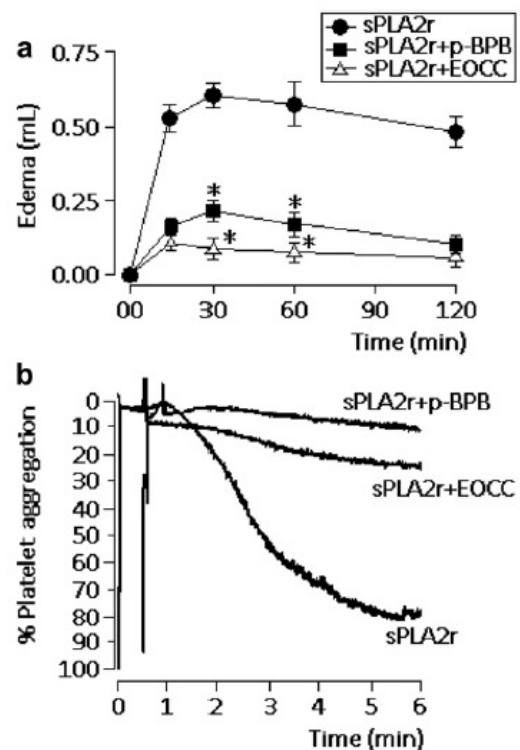


Fig. 3. (a) Effect of EOCC on sPLA2r-induced edema in the rat paw. Paw volume was measured prior to injection of the drugs and at selected times thereafter using a hydroplethysmometer. All drugs were dissolved in sterile 0.9% saline solution. Results were expressed as the increase in paw volume (mL) calculated by subtracting the basal volume. Maximal edema was observed at 30 min (approximately 0.6 mL for native sPLA2r), with edema being decreased by pBPB or EOCC co-incubation. Each point represents the mean $\pm$ SEM ($n = 4$). * $p < 0.05$. (b) Comparison of platelet aggregation induction in platelet-rich plasma (PRP). Aggregation experiments were performed with 10 μ g sPLA2r or sPLA2r + EOCC in a final volume of 20 μ L, and aggregation was recorded for 5–10 min with an aggregometer. Native sPLA2r induced $91.54 \pm 9.3\%$ platelet aggregation, while co-incubation of sPLA2r with pBPB or EOCC reduced the aggregation to $6.4 \pm 3.4\%$ and $18.56 \pm 6.5\%$, respectively.

Instruments, Inc, Buffalo, NY). Aggregation experiments were performed using 10 μ g sPLA2r or sPLA2r + EOCC in a final volume of 20 μ L. Native sPLA2r induced irreversible platelet aggregation ($91.54 \pm 9.3\%$, $n = 4$, $p < 0.05$). On the other hand, sPLA2r + EOCC and sPLA2r + pBPB induced platelet aggregation of only $18.56 \pm 6.5\%$ ($n = 4$, $p < 0.05$) and $6.4\% \pm 3.4$ ($n = 4$, $p < 0.05$), respectively (Fig. 3c).

Our data show that, similar to pBPB, EOCC strongly decreases the enzyme activity of sPLA2r. Moreover, mass spectrometry suggests that EOCC forms a stable complex with sPLA2r. The stoichiometry of two molecules of EOCC per molecule of sPLA2r is similar to that of umbelliferone (Toyama et al., 2009). The shift in the retention time of sPLA2r after incubation with EOCC also indicates a strong interaction. The inhibitory mechanism of coumarin involves nucleophilic attack of amino acid residues and binding to the large hydrophobic pocket of chymotrypsin. These features were shown to be necessary for the interaction of this compound with proteins (Ghani et al., 2001; Hyun and Kim, 2004). Blockade of the coumarin benzopyran structure and significant structural changes in the protein have been shown to occur after treatment with 7-hydroxycoumarin (7-HOC). EOCC may work by a similar mechanism of action. Two molecules of EOCC react with the hydrophobic pocket of sPLA2r, similar to what has been observed for 7-HOC (Toyama et al., 2009). The loss of hydrophobic pocket integrity induces an irreversible loss of enzyme activity. Consequently, all biological effects that depend on the catalytic activity of sPLA2 are virtually abolished. Since the stability of the alpha helix in the hydrophobic cavity should be affected by the stability of other structures such as the calcium-binding loop or beta wing, it is possible that pharmacological effects induced by sPLA2 interaction with the receptor are similarly affected, as observed by Valentin and Lambeau (2000), Oliveira et al. (2002), and Toyama et al. (2009). This hypothesis is strongly supported by studies of sPLA2 modified with other polyphenolic compounds (Iglesias et al., 2005; Toyama et al., 2009) as well as by other studies (Harper and Powers, 1985; Liu et al., 2008).

In conclusion, EOCC is a useful tool for advancing our knowledge of the structure and function of sPLA2 as well as the pharmacological effects of related plant-derived polyphenolic compounds such as coumarins, flavonoids, terpenoids, and alkaloids.

Acknowledgments

We would like to thank FAPESP, CNPq, CAPES, UNICAMP, and UNESP for supporting this work.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest.

References

- Ashwood, V.A., Buckingham, R.E., Cassidy, F., Evans, J.M., Faruk, E.A., Hamilton, T.C., Nash, D.J., Stemp, G., Willcocks, K., 1986. Synthesis and antihypertensive activity of 4-(cyclic amido)-2H-1-benzopyrans. *J. Med. Chem.* 29 (11), 2194–2201.
- de Castro, R.C., Landucci, E.C., Toyama, M.H., Giglio, J.R., Marangoni, S., De Nucci, G., Antunes, E., 2000. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A₂ into the rat pleural cavity. *Toxicon* 38 (12), 1773–1785.
- Diz Filho, E.B., Marangoni, S., Toyama, D.O., Fagundes, F.H., Oliveira, S.C., Fonseca, F.V., Calgarotto, A.K., Joazeiro, P.P., Toyama, M.H., 2009. Enzymatic and structural characterization of new PLA2 isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*. *Toxicon* 53 (1), 104–114.
- Fonseca, F.V., Antunes, E., Morganti, R.P., Monteiro, H.S., Martins, A.M., Toyama, D.O., Marangoni, S., Toyama, M.H., 2006. Characterization of a new platelet aggregating factor from crotoxin *Crotalus durissus cascavella* venom. *Protein J.* 25 (3), 183–192.
- Ghani, U., Ng, K.K., Atta ur, Rahman, Choudhary, M.I., Ullah, N., James, M. N., 2001 Nov 30. Crystal structure of gamma-chymotrypsin in complex with 7-hydroxycoumarin. *J. Mol. Biol.* 314 (3), 519–525.
- Harper, J.W., Powers, J.C., 1985. Reaction of serine proteases with substituted 3-alkoxy-4-chloroisocoumarins and 3-alkoxy-7-amino-4-chloroisocoumarins: new reactive mechanism-based inhibitors. *Biochemistry* 24 (25), 7200–7213.
- Hyun, M.H., Kim, D.H., 2004 May 15. Spacer length effect of a chiral stationary phase based on (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid. *Chirality* 16 (5), 294–301.
- Iglesias, C.V., Aparicio, R., Rodrigues-Simioni, L., Camargo, E.A., Antunes, E., Marangoni, S., de Oliveira Toyama, D., Beriam, L.O., Monteiro, H.S., Toyama, M.H., 2005. Effects of morin on snake venom phospholipase A₂ (PLA₂). *Toxicon* 46 (7), 751–758.
- Kim, J.N., Lee, K.Y., 2002. Synthesis of cyclic compounds from the Baylis-Hillman Adducts. *Curr. Org. Chem.* 6, 627–645.
- Lima, A.A., Nascimento, N.R., Fang, G.D., Yotseff, P., Toyama, M.H., Guerrant, R.L., Fonteles, M.C., 2008. Role of phospholipase A₂ and tyrosine kinase in *Clostridium difficile* toxin A-induced disruption of epithelial integrity, histologic inflammatory damage and intestinal secretion. *J. Appl. Toxicol.* 28 (7), 849–857.
- Liu, X.H., Xi, P.X., Chen, F.J., Xu, Z.H., Zeng, Z.Z., 2008. Spectroscopic studies on binding of 1-phenyl-3-(coumarin-6-yl) sulfonylurea to bovine serum albumin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 92 (2), 98–102.
- Oliveira, D.G., Toyama, M.H., Novello, J.C., Beriam, L.O., Marangoni, S., 2002. Structural and functional characterization of basic PLA₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *J. Protein Chem.* 21 (3), 161–168.
- Oliveira, S.C., Fonseca, F.V., Antunes, E., Camargo, E.A., Morganti, R.P., Aparicio, R., Toyama, D.O., Beriam, L.O., Nunes, E.V., Cavada, B.S., Nagano, C.S., Sampaio, A.H., Nascimento, K.S., Toyama, M.H., 2008. Modulation of the pharmacological effects of enzymatically-active PLA₂ by BTL-2, an isolectin isolated from the *Bryothamnion triquetrum* red alga. *BMC Biochem.* 9, 16.
- Toyama, D.O., Marangoni, S., Diz-Filho, E.B., Oliveira, S.C., Toyama, M.H., 2009. Effect of umbelliferone (7-hydroxycoumarin, 7-HOC) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *Toxicon* 53 (4), 417–426.
- Toyama, M.H., de Oliveira, D.G., Beriam, L.O., Novello, J.C., Rodrigues-Simioni, L., Marangoni, S., 2003. Structural, enzymatic and biological properties of new PLA₂ isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon* 41 (8), 1033–1038.
- Toyama, M.H., Toyama, D.O., Joazeiro, P.P., Cameiro, E.M., Beriam, L.O., Marangoni, L.S., Boscherio, A.C., 2005. Biological and structural characterization of a new PLA₂ from the *Crotalus durissus collilineatus* venom. *Protein J.* 24 (2), 103–112.
- Valentin, E., Lambeau, G., 2000. Increasing molecular diversity of secreted phospholipase A₂ and their receptor and binding protein. *Biochem. Biophys. Acta* 1488, 59–70.